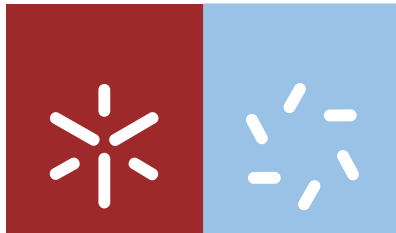


Universidade do Minho
Escola de Ciências

Liliana Sofia Peixoto Ferreira

**Desenvolvimento de embalagens
alimentares poliméricas com
propriedades antimicrobianas**



Universidade do Minho

Escola de Ciências

Liliana Sofia Peixoto Ferreira

**Desenvolvimento de embalagens
alimentares poliméricas com
propriedades antimicrobianas**

Dissertação de Mestrado

Mestrado em Técnicas de Caracterização e Análise Química

Trabalho efetuado sob a orientação da

Professora Doutora Isabel Correia Neves

e da

Professora Doutora Cristina Aguiar

DECLARAÇÃO

Nome: Liliana Sofia Peixoto Ferreira

Endereço eletrónico: pg17908@alunos.uminho.pt

Título da tese de mestrado: Desenvolvimento de embalagens alimentares poliméricas com propriedades antimicrobianas

Orientador(es): Professora Doutora Isabel Correia Neves e Professora Doutora Cristina Aguiar

Ano de conclusão: 2012

Designação do Mestrado: Mestrado em Técnicas de Caracterização e Análise Química

DE ACORDO COM A LEGISLAÇÃO EM VIGOR, NÃO É PERMITIDA A
REPRODUÇÃO DE QUALQUER PARTE DESTA TESE/TRABALHO

Universidade do Minho, ____/____/____

Assinatura: _____

Agradecimentos

Gostaria de expressar os mais sinceros agradecimentos às várias pessoas que, de forma direta ou indireta, deram o seu contributo para a concretização deste projeto.

Às minhas orientadoras, Professora Doutora Isabel Correia Neves e Professora Doutora Cristina Aguiar, bem como à Professora Doutora Gabriela Botelho e Professor Doutor António Maurício Fonseca, agradeço a oportunidade de poder realizar este trabalho. Tenho também a agradecer pela disponibilidade, ensinamentos, boa disposição, optimismo e espírito de incentivo que sempre me prestaram e transmitiram.

À Dr^a Elisabete Costa e à Eng^a Manuela Teixeira, da Empresa *Amtor Flexibles* Porto, pela atenção, disponibilidade, simpatia e partilha de informações e materiais essenciais à realização do trabalho.

Ao Doutor Hugo Figueiredo pela disponibilidade e ajuda prestada na preparação dos zeólitos, bem como pela simpatia e conhecimentos partilhados.

Ao Departamento de química, Departamento de Biologia e Departamento de Engenharia de Polímeros agradeço pelo espaço e por me terem facultado os materiais necessários à realização do trabalho.

Aos meus colegas de laboratório pelo apoio, incentivo e bom ambiente de trabalho.

Aos meus amigos, em especial à Andreia, Ana Lapão, Isabel, Natália e Paulo por estarem sempre disponíveis para me ajudar, por acreditarem em mim e pelos bons momentos que sempre me proporcionaram. Um agradecimento especial também aos novos colegas que se fizeram nesta fase, nomeadamente Daniela, Pedro, Renato, por todo o apoio, incentivo, espírito de entreajuda e momentos de boa disposição proporcionados

A minha família por estar sempre presente, pelo incentivo e carinho que sempre me deram ao longo de todo o meu percurso académico.

A todos, um sincero e profundo obrigado!

Resumo

A globalização do mercado, assim como o modo de vida cada vez mais agitado dos consumidores tem contribuído significativamente para o crescimento da indústria das embalagens alimentares. O desenvolvimento de embalagens poliméricas com propriedades antimicrobianas tem-se revelado um fator preponderante no aumento do tempo de vida, segurança e qualidade dos alimentos. Num ambiente industrial, a incorporação de agentes antimicrobianos em polímeros pode compreender a utilização de processos térmicos como fusão, extrusão e injeção por molde. Contudo, a utilização deste tipo de processos limita a seleção dos agentes antimicrobianos, uma vez que estes devem possuir elevada estabilidade térmica.

Neste contexto, o presente trabalho tem como objetivo desenvolver filmes compósitos com propriedades antimicrobianas para aplicação em embalagens alimentares. As propriedades antimicrobianas dos filmes compósitos de polietileno foram obtidas através da incorporação do zeólito Y, estrutura termicamente estável, permutado com um ou dois íões metálicos, tais como: prata, cobre e zinco. Estes materiais, zeólitos modificados e filmes compósitos, foram caracterizados por diversas técnicas analíticas tais como: microscopia eletrónica de varrimento acoplado com EDX, espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier, espectroscopia fotoelectrónica de raios-X, difração de raios-X e análises químicas. Foram também submetidos a ensaios para avaliação das suas propriedades antimicrobianas utilizando como microrganismos indicadores de sensibilidade as bactérias *Escherichia coli* (gram-negativa) e *Bacillus subtilis* (gram-positiva) e as leveduras *Candida albicans* e *Saccarohmyces cerevisiae*. A atividade antimicrobiana dos zeólitos foi avaliada através da contagem do número de unidades formadoras de colónias registadas na sua presença; por sua vez, nos filmes compósitos, recorreu-se a uma adaptação do teste de difusão em placa para detetar a formação de halos de inibição do crescimento microbiano em torno do compósito.

A caracterização morfológica e estrutural dos zeólitos monometálicos e bimetálicos mostraram que a inserção de íões metálicos não alterou a integridade da estrutura cristalina. Os ensaios de atividade antimicrobiana demonstraram que os zeólitos ZnAgY 0,025 M e ZnAgY 0,05 M exibem essa propriedade a partir de uma concentração mínima de 0,1 mg/mL contra as bactérias e de 0,3 mg/mL contra as leveduras testadas.

Os zeólitos AgY 0,05 M; ZnAgY 0,025 M e ZnAgY 0,05 M foram incorporados nas percentagens de 1, 3 e 5 % (p/p) no filme de polietileno. Apenas os filmes compósitos com 3 e 5 % de amostras zeolíticas apresentaram atividade antimicrobiana. Perante estes resultados, os filmes compósitos revelaram-se bastante promissores em termos de controlo microbiano.

Abstract

Market globalization as well as consumers way of life has contributed significantly to the growth of the food packaging industry. The development of polymeric packaging with antimicrobial properties has proved a major factor in extending food shelf life, safety and quality. In an industrial environment, the incorporation of antimicrobial agents in polymers may comprise the use of processes such as heat fusion, extrusion and injection molding. However, the use of such processes limits the selection of antimicrobial agents, since they must have high thermal stability.

In this context, this study aims to develop composites with antimicrobial properties for application in food packaging. The antimicrobial properties of the composite films of polyethylene were obtained by incorporation of the zeolite Y, porous stable structure, exchanged with one or two metal ions such as silver, copper and zinc. These materials, modified zeolites and composite films were characterized by various analytical techniques such as scanning electron microscopy with EDX, Fourier transformed infrared spectroscopy, X-ray photoelectron spectroscopy, X-ray diffraction and chemical analyzes. The antimicrobial properties of these materials were investigated on bacteria - *Escherichia coli* (Gram negative) and *Bacillus subtilis* (Gram positive) - and yeast - *Candida albicans* and *Saccharomyces cerevisiae*. The antimicrobial activity of zeolites was assessed by counting the number of colony forming units obtained in its presence. In turn, an adaptation of the plate diffusion test was used to detect antimicrobial properties of the composite films, through the formation of growth inhibition zones around the composite.

The morphological and structural characterization of monometal and bimetal zeolites showed that the inclusion of metal ions did not change the integrity of the crystalline structure. In antibacterial activity assays the zeolites ZnAgY 0.025 M and ZnAgY 0.05 M exhibited MIC values of 0.1 mg/ml against bacteria and 0.3 mg/mL against yeast.

Zeolites Agy 0.05 M, ZnAgY 0.025 M and ZnAgY 0.05 M were added in ratios of 1, 3 and 5% (wt/wt) in a polyethylene film. Only the composite films with 3 and 5% of modified zeolite samples showed antimicrobial activity. Given these results, the composite films have proved very promising in terms of microbial control.

Índice

Agradecimentos.....	iii
Resumo	v
Abstract.....	vii
Índice	ix
Abreviaturas.....	xiii
Índice de figuras.....	xv
Índice de tabelas	xix
Capítulo 1- Introdução	1
1.1. Enquadramento do trabalho.....	3
1.2. Objetivos	4
1.3. Estrutura da tese	5
Capítulo 2 - Estado da arte	7
2.1. Contaminação microbiana de alimentos	9
2.2. Embalagens antimicrobianas	10
2.2.1. Classificação das embalagens	11
2.2.2. Polímeros	13
2.2.2.1. Polietileno.....	14
2.3. Zeólitos.....	15
2.3.1. Estrutura dos zeólitos	16
2.3.1.1. Zeólitos FAU.....	17
2.3.2. Zeólitos como agentes antimicrobianos.....	18
2.3.2.1. Prata.	19
2.3.2.2. Cobre	21
2.3.2.3. Zinco	22
2.3.3. Preparação de zeólitos modificados com iões metálicos	22
2.4. Compósitos antimicrobianos.....	24
2.5. Legislação	25

Capítulo 3	27
3.1. Materiais e reagentes	29
3.1.1. Materiais	29
3.1.2. Reagentes	29
3.2. Seleção da estrutura faujasite.....	30
3.3. Preparação das amostras.....	30
3.3.1. Permuta iônica - Zeólitos	30
3.3.1.1. Preparação de zeólitos monometálicos	30
3.3.1.2. Preparação de zeólitos bimetálicos.....	32
3.3.2. Preparação dos compósitos em filmes de Polietileno.....	32
3.4. Técnicas de caracterização.....	33
3.4.1. Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)	33
3.4.2. Microscopia eletrônica de varrimento (SEM).....	35
3.4.3. Difração de raios-X (XRD).....	37
3.4.4. Espectroscopia fotoeletrônica de raios-X (XPS)	39
3.4.5. Espectroscopia de emissão atômica (análise química)	41
3.5. Avaliação da atividade antimicrobiana	42
3.5.1. Microrganismos	42
3.5.2. Meios de cultura e condições de crescimento	42
3.5.3. Avaliação da atividade antimicrobiana dos zeólitos em pó.....	43
3.5.4. Avaliação da atividade antimicrobiana dos filmes compósitos de polietileno.....	44
 Capítulo 4	 45
4.1. Seleção da estrutura FAU.....	47
4.1.1. Análises morfológicas e estruturais por SEM, XRD e FTIR	47
4.1.2. Análise superficial (XPS).....	48
4.1.3. Análise química	51
4.1.4. Análise do potencial antimicrobiano	52
4.2. Zeólitos monometálicos e bimetálicos	54
4.2.1. Análise por SEM e EDX.....	58
4.2.2. Análise por FTIR	61
4.2.3. Análise química	62
4.2.4. Análise por XRD.....	63
4.2.5. Avaliação das propriedades antimicrobianas.....	65

4.3. Filmes poliméricos.....	69
4.3.1. Análise por SEM	70
4.3.2. Análise por FTIR	71
4.3.3. Avaliação das propriedades antimicrobianas dos filmes compósitos	74
Capítulo 5	77
Capítulo 6	81
Capítulo 7	85

Abreviaturas

(-):	Inibição de crescimento microbiano
(+):	Presença de crescimento microbiano
Ag⁺:	Prata iônica
Ag⁰:	Prata metálica
Ag-zeólito:	Zeólito permutado com prata
AgX:	Zeólito X permutado com prata
AgCuY:	Zeólito Y permutado com prata e cobre
AgY:	Zeólito Y permutado com prata
AgZnY:	Zeólito Y permutado com prata e zinco
Cu²⁺:	Ião cobre
CuY:	Zeólito Y permutado com cobre
CuAgy:	Zeólito Y permutado com cobre e prata
CuZnY:	Zeólito Y permutado com cobre e zinco
EFSA:	<i>European Food Safety Authority</i>
EVOH:	Álcool de etileno-vinil (do inglês <i>Ethylene Vinyl Alcohol</i>)
FAU:	Código de 3 letras da <i>International Zeolite Association</i> para a estrutura cristalina do tipo faujasite
FDA:	<i>Food and Drug Administration</i>
FTIR:	Espetroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (do inglês <i>Fourier Transformed Infrared Spectroscopy</i>)
HDPE:	Polietileno de elevada densidade (do inglês <i>High - density polyethylene</i>)
hkl:	Índices de Miller
ICP-AES	Espetroscopia de emissão atômica com plasma acoplado indutivamente (do inglês <i>Inductively coupled plasma atomic emission spectroscopy</i>)
IV:	Infravermelho
IZA:	<i>International Zeolite Association</i>
LB:	Meio de cultura <i>Lysogeny Broth</i>
LBA:	Meio de cultura <i>Lysogeny Broth</i> suplementado com agar
LDPE:	Polietileno de baixa densidade (do inglês <i>Low - density polyethylene</i>)
LLDPE:	Polietileno linear e de baixa densidade (do inglês <i>Linear low - density polyethylene</i>)
LTA:	Código de 3 letras da <i>International Zeolite Association</i> para a estrutura cristalina do tipo <i>Linde Type A</i>

LTL:	Código de 3 letras da <i>International Zeolite Association</i> para a estrutura cristalina do tipo <i>Linde Type L</i>
MIC:	Concentração mínima inibitória (do inglês <i>Minimum Inhibitory Concentration</i>)
NaY:	Zeólito Y na sua forma básica
NC:	Zeólito Natural Clinoptilolite
PA:	Poliamida
PE:	Polietileno
PP:	Polipropileno
PS:	Poliestireno
PVA:	Poli (vinil álcool)
PVC:	Poli (vinil cloreto)
ROS:	Espécies reativas de oxigénio (do inglês <i>reactive oxygen species</i>)
TSA:	Meio de cultura <i>Trypticase Soy Agar</i>
TSB:	Meio de cultura <i>Trypticase Soy Broth</i>
UFC:	Unidades formadoras de colónias
UFC_{M-Y}	Unidades formadoras de colónias na presença do zeólito Y permutado com os diferentes iões metálicos (M)
UFC_Y	Unidades formadoras de colónias na presença do zeólito Y
USY:	Zeólito Y ultra - estável
XPS:	Espetroscopia fotoeletrónica de raios - X (do inglês <i>X-ray photoelectron spectroscopy</i>)
XRD:	Difração de raios- X (do inglês <i>X-ray diffraction</i>)
YPD:	Meio de cultura <i>Yeast Peptone Dextrose</i>
Zn²⁺:	Iões Zinco
YPDA :	Meio de cultura <i>Yeast Peptone Dextrose</i> suplementado com agar
ZnAgY:	Zeólito Y permutado com zinco e prata
ZnCuY:	Zeólito Y permutado com zinco e cobre
ZnY:	Zeólito Y permutado com zinco

Índice de figuras

Figura 2.1. Sistemas de embalagens antimicrobianas. (Modificado de [17])	12
Figura 2.2. Unidade de repetição do polietileno [42].	14
Figura 2.3. Diferentes categorias de polietileno: HDPE, LDPE e LLDPE [43].	15
Figura 2.4. Arranjo tridimensional dos tetraedros TO ₄ (em que T é Al ou Si) na estrutura cristalina dos zeólitos [65].	16
Figura 2.5. Estrutura porosa FAU com representação da supercavidade, cavidade sodalite, dos duplos prismas hexagonais assim como os locais preferenciais de permuta em cada cavidade. Modificado de [72]	17
Figura 2.6. Diâmetros das cavidades presentes na estrutura FAU. Modificado de [72]	18
Figura 2.7. Mecanismos de atividade antimicrobiana dos íões prata em bactérias. [95].	19
Figura 2.8. Estrutura do filme laminado com Ag-zeólito [116].	24
Figura 3.1. Representação do gradiente de temperatura utilizado no procedimento de calcinação das amostras preparadas. Curva 1 corresponde à fase de aquecimento dos 20 °C até aos 500 °C, à velocidade de 5 °C/min (1h30min). Curva 2 a temperatura é mantida a 500 °C durante 8 horas. Por último, a curva 3 representa o arrefecimento até à temperatura ambiente. Foi utilizado um fluxo de ar de 30-40 mL/min durante as calcinações. [Modificado de 50]	31
Figura 3.2. Seis tipos diferentes de modos vibracionais de uma molécula. As duas primeiras são exemplos de estiramento simétrico e assimétrico, e os outros quatro de deformação (os símbolos “+” e “-” referem-se a vibrações que são perpendiculares ao plano da página ^[126]	33
Figura 3.3. Espectro de infravermelho do zeólito Y [59].	34
Figura 3.4. Representação esquemática de algumas das radiações emitidas após colisão de um feixe de eletrões na superfície de um material condutor [135].	36
Figura 3.5. Difractograma do zeólito NaY apresentando os índices de Miller 533, 642 e 555 e o pico do padrão interno quartzo assinalado por “Q” [49].	38
Figura 3.6. Representação esquemática da espectroscopia electrónica [adaptado de 140].	40
Figura 4.1. Espetros de XPS de NaX (a) e AgX (b).	48
Figura 4.2. Espetros alta resolução de AgX e AgY na região Ag 3d	49
Figura 4.3. Ensaio para avaliação da atividade antimicrobiana contra <i>S. cerevisiae</i> na ausência de zeólito (a) e na presença de NaY 1,0 mg /mL (b) e AgY 1,0 mg /mL (c).	52
Figura 4.4. Eficiência antimicrobiana (%) de AgX e AgY contra a bactéria gram-negativa <i>E. coli</i> (a) e a bactéria gram-positiva <i>B. subtilis</i> (b) na gama de concentrações de 0,01 a 1 mg/mL. A eficiência	

antimicrobiana foi determinada tendo em consideração o número de UFC observadas para o zeólito Y e para o mesmo zeólito permutado com prata. As barras de erro apresentadas correspondem ao desvio padrão de três réplicas.	53
Figura 4.5. Eficiência antimicrobiana (%) de AgX e AgY contra as leveduras <i>S. cerevisiae</i> (a) e <i>C. albicans</i> (b) na gama de concentrações de 0,01 a 1 mg/mL. A eficiência antimicrobiana foi determinada tendo em consideração o número de UFC observadas para o zeólito Y e para o mesmo zeólito permutado com prata. As barras de erro apresentadas correspondem ao desvio padrão de três réplicas.	54
Figura 4.6. Eficiência antimicrobiana (%) dos zeólitos monometálicos (AgY, CuY, ZnY) e bimetálicos (AgCuY, AgZnY, CuZnY, CuAgY, ZnAgY) contra <i>E. coli</i> para as concentrações 0,5;1 e 2 mg/mL. A eficiência antimicrobiana foi determinada tendo em consideração o número de UFC observadas para o zeólito Y e para o mesmo zeólito permutado com os diferentes iões metálicos. As barras de erro apresentadas correspondem ao desvio padrão de três réplicas.	55
Figura 4.7. Eficiência antimicrobiana (%) dos zeólitos monometálicos (AgY, CuY, ZnY) e bimetálicos (AgCuY, AgZnY, CuZnY, CuAgY, ZnAgY) contra <i>B. subtilis</i> . A eficiência antimicrobiana foi determinada tendo em consideração o número de UFC observadas para o zeólito Y e para o mesmo zeólito permutado com os diferentes iões metálicos. As barras de erro apresentadas correspondem ao desvio padrão de três réplicas.	55
Figura 4.8. Eficiência antimicrobiana (%) dos zeólitos monometálicos (AgY, CuY, ZnY) e bimetálicos (AgCuY, AgZnY, CuZnY, CuAgY, ZnAgY) contra <i>C. albicans</i> . A eficiência antimicrobiana foi determinada tendo em consideração o número de UFC observadas para o zeólito Y e para o mesmo zeólito permutado com os diferentes iões metálicos. As barras de erro apresentadas correspondem ao desvio padrão de três réplicas.	56
Figura 4.9. Eficiência antimicrobiana (%) dos zeólitos monometálicos (AgY, CuY, ZnY) e bimetálicos (AgCuY, AgZnY, CuZnY, CuAgY, ZnAgY) contra <i>S. cerevisiae</i> . A eficiência antimicrobiana foi determinada tendo em consideração o número de UFC observadas para o zeólito Y e para o mesmo zeólito permutado com os diferentes iões metálicos. As barras de erro apresentadas correspondem ao desvio padrão de três réplicas.....	56
Figura 4.10. Micrografias de SEM de NaY (a); ZnAgY 0,025 M (b); ZnAgY 0,050 M (c) e AgY 0,025 M (d) com a mesma resolução.....	59
Figura 4.11. Espetros de EDX de AgY 0,025 M; ZnAgY 0,025 M e ZnAgY 0,050 M	60
Figura 4.12. Espetros de FTIR de NaY; AgY 0,025 M; ZnY 0,05 M; ZnAgY 0,025 M e ZnAgY 0,05 M.....	61
Figura 4.13. Difractogramas de raios-X de NaY; AgY 0,025 M; ZnAgY 0,025 M e ZnAgY 0,050 M.....	64
Figura 4.14. Eficiência antimicrobiana (%) dos zeólitos AgY 0,025 M; ZnAgY 0,025 M e ZnAgY 0,050 M contra <i>E. coli</i> . A eficiência antimicrobiana foi determinada tendo em consideração o número de UFC	

observadas para o zeólito Y e para o mesmo zeólito permutado com os diferentes íons metálicos. As barras de erro apresentadas correspondem ao desvio padrão de três réplicas.	65
Figura 4.15. Eficiência antimicrobiana (%) dos zeólitos AgY 0,025 M; ZnAgY 0,025 M e ZnAgY 0,050 M contra <i>B. subtilis</i> . A eficiência antimicrobiana foi determinada tendo em consideração o número de UFC observadas para o zeólito Y e para o mesmo zeólito permutado com os diferentes íons metálicos. As barras de erro apresentadas correspondem ao desvio padrão de três réplicas.....	66
Figura 4.16. Ensaio para avaliação do potencial antimicrobiano contra <i>E. coli</i> (1ª e 2ª fila de cada placa) e <i>B. subtilis</i> (3ª e 4ª fila) do zeólito NaY 0,5 mg/mL (a); AgY 0,025 M 0,3 mg/mL (b) e AgY 0,025 M 0,5 mg/mL (c).	67
Figura 4.17. Eficiência antimicrobiana (%) dos zeólitos AgY 0,025 M; ZnAgY 0,025 M e ZnAgY 0,050 M contra <i>S. cerevisiae</i> . A eficiência antimicrobiana foi determinada tendo em consideração o número de UFC observadas para o zeólito Y e para o mesmo zeólito permutado com os diferentes íons metálicos. As barras de erro apresentadas correspondem a três réplicas.	68
Figura 4.18. Eficiência antimicrobiana (%) dos zeólitos AgY 0,025 M; ZnAgY 0,025 M e ZnAgY 0,050 M contra <i>C. albicans</i> . A eficiência antimicrobiana foi determinada tendo em consideração o número de UFC observadas para o zeólito Y e para o mesmo zeólito permutado com os diferentes íons metálicos. As barras de erro apresentadas correspondem a três réplicas.	68
Figura 4.19. Aspeto dos filmes compósitos preparados a partir de ZnAgY 0,025 M 1%,3% e 5% (p/p); ZnAgY 0,050 M 1%, 3% e 5% (p/p) e de AgY 0,050 M 1%, 3% e 5% (p/p).	70
Figura 4.20. Micrografias de SEM do filme compósito com 1 % ZnAgY 0,025 M (a), zona espessa de 3% ZnAgY 0,025 M (b) zona fina de 3% ZnAgY 0,025 M (c) e 5 % de ZnAgY 0,025 M (d).	71
Figura 4.21. Espectros de infravermelho das zonas mais espessas dos filmes compósitos com 1, 3 e 5 % (p/p) de ZnAgY 0,025 M; polietileno e ZnAgY 0,025 M: (I) região de 4000-400 cm^{-1} e (II) região 1500-500 cm^{-1}	72
Figura 4.22. Espectros de infravermelho das zonas mais finas dos filmes compósitos com 1, 3 e 5 % (p/p) de ZnAgY 0,025 M; polietileno e ZnAgY 0,025 M: (I) região de 4000-400 e (II) região 1500-500 cm^{-1}	73
Figura 4.23. Placas de Petri inoculadas com <i>C. albicans</i> nos quais foram colocados os discos das diferentes zonas de espessura dos filmes compósitos AgY 0,050 M, ZnAgY 0,050 M e ZnAgY 0,025 M nas percentagens de 1, 3 e 5 % (p/p).	75

Índice de tabelas

Tabela 3.1. Características dos reagentes utilizados na permuta iônica.....	29
Tabela 3.2. Zeólitos monometálicos	31
Tabela 3.3. Zeólitos bimetálicos preparados	32
Tabela 3.4. Bandas características de Polietileno [131,132]	35
Tabela 3.5. Constituição do meio <i>Lysogeny Broth</i> suplementado com agar	42
Tabela 3.6. Constituição do meio Yeast Peptone Dextrose Agar	42
Tabela 4.1. Resultados das análises de SEM e XRD das amostras NaX, AgX, NaY, AgY obtidos no projeto de licenciatura [124].....	48
Tabela 4.2. Energias de ligação dos elementos presentes nas estruturas zeolíticas.....	49
Tabela 4.3. Caracterização atômica superficial das estruturas zeolíticas.....	50
Tabela 4.4. Propriedades físico-químicas das estruturas zeolíticas.....	51
Tabela 4.5. Valores de MIC (mg/mL) para AgY e AgX contra cada uma dos microrganismos testados.....	53
Tabela 4.6. Valores de MIC (mg/mL) para os zeólitos monometálicos e bimetálicos contra os diferentes microrganismos em estudo.....	57
Tabela 4.7. Composição atômica (%) das amostras AgY 0,025 M; ZnAgY 0,025 M e ZnAgY 0,050 M obtida por EDX.....	60
Tabela 4.8. Razões Si/Al determinadas por FTIR das amostras NaY; ZnAgY 0,050 M; ZnAgY 0,025 M; AgY 0,025 M e ZnY 0,050 M.....	62
Tabela 4.9. Percentagem de prata e zinco introduzida nas estruturas zeolíticas.....	62
Tabela 4.10. Número de Prata e Zinco por célula unitária de zeólito Y.....	63
Tabela 4.11. Informação estrutural das amostras obtidas por XRD.....	64
Tabela 4.12. Dimensão dos halos de inibição de crescimento (em mm) obtidos para os diferentes filmes compósitos. (HT- significa halo turvo).....	74
Tabela 4.13. Tabela resumo dos resultados de suscetibilidade microbiana obtidos pelo teste de difusão em placa para as zonas mais espessas dos filmes compósitos com 1, 3 e 5 % (p/p) de zeólito. (-) Inibição de crescimento e (+) presença de crescimento microbiano.....	76

Capítulo 1

INTRODUÇÃO

1.1. ENQUADRAMENTO DO TRABALHO

As embalagens alimentares começaram a ser introduzidas no século XIX, com a invenção das conservas por Nicholas Appert. Por sua vez, em meados do século XX começaram a ser utilizadas latas de metal, garrafas de vidro e caixas de madeira para a distribuição de alimentos e bebidas. Algumas das inovações nesta área surgiram de uma forma inesperada, tal como é o caso do celofane. A produção deste material resultou de inúmeras tentativas falhadas de E. Brandenberger para produzir toalhas de mesa transparentes [1,2].

O período decorrente entre a primeira Guerra Mundial e a Segunda Guerra Mundial foi aquele em que houve um maior desenvolvimento de embalagens, devido à necessidade de proteção dos bens alimentares essenciais aos soldados [1]. Desta forma, foram surgindo os plásticos derivados de polímeros, embalagens assépticas, latas de cerveja metálicas, embalagens flexíveis e a impressão flexográfica. Atualmente, os plásticos têm sido os materiais mais aplicados em embalagens alimentares, devido ao seu baixo peso, baixo custo, facilidade de processamento e variabilidade das propriedades físicas [2,3].

A principal função que uma embalagem alimentar deve desempenhar é a função de barreira, isto é, deve possuir a capacidade de proteger o alimento de influências ambientais como calor, luz, oxigénio, humidade, pressão, enzimas, odores, partículas de pó, microrganismos, entre outros, que podem alterar as suas propriedades sensoriais, bem como a sua segurança. Outros aspetos importantes das embalagens são as funções de comodidade, *marketing* (design apelativo) e comunicação. Esta última função é imprescindível para o consumidor, pois é a partir dos rótulos presentes nas embalagens que adquirem a informação sobre a proveniência, data de validade, ingredientes, valores nutricionais e preocupações de uso do produto. Uma embalagem deve ainda ser segura, inerte, barata, fácil de produzir, leve, fácil de eliminar ou reutilizar, capaz de resistir a condições extremas durante as etapas de processamento, acondicionamento, armazenamento e transporte [3,4]. A globalização do mercado e também o estilo de vida ocupado dos consumidores, que resulta em menor tempo gasto na compra de alimentos frescos e num maior consumo de produtos pronto-a-comer, tem-se refletido numa crescente necessidade do melhoramento da segurança, qualidade e tempo de vida do produto embalado. Neste sentido, nas últimas décadas tem-se assistido a uma grande dinâmica na investigação e desenvolvimento de sistemas de embalagens cada vez mais sofisticados e adequados às necessidades do produtor, distribuidor e consumidor final [1,4,5].

Um dos passos mais importantes para a indústria alimentar foi o desenvolvimento das embalagens ativas. Este tipo de embalagens são normalmente definidas como um sistema no qual o produto, a embalagem e o ambiente interagem de uma forma positiva a fim de aumentar o tempo

de vida ou melhorar a segurança microbiana dos produtos alimentares, enquanto mantêm a sua qualidade [6-9]. A maior vantagem destas embalagens é que contribuem significativamente para a redução da deterioração dos alimentos sem a utilização excessiva de aditivos e conservantes [10,11].

As técnicas de embalagens ativas para a preservação e melhoramento da qualidade e segurança dos alimentos podem ser divididas em quatro categorias: sistemas de absorção, sistemas de libertação, sistemas de controlo de temperatura e sistemas de controlo microbiano. Os sistemas de absorção removem compostos indesejáveis como oxigénio, dióxido de carbono, etileno, excesso de água, impurezas e outros compostos específicos. Os sistemas de libertação adicionam ou emitem compostos para o interior da embalagem alimentar como dióxido de carbono, antioxidantes ou conservantes. Dentro dos sistemas de controlo de temperatura temos por exemplo as embalagens com capacidade de auto-aquecimento e auto-refrigeração. Nos sistemas com auto-aquecimento é utilizado cálcio, óxido de magnésio e água para gerar uma reação exotérmica. Por sua vez, os sistemas com auto-refrigeração envolvem a evaporação de um composto externo que remove o calor (usualmente água que é evaporada e absorvida na superfície). Por último, os sistemas de controlo microbiano compreendem a utilização de agentes antimicrobianos com o objetivo de reduzirem as contaminações à superfície e no interior dos alimentos processados. Nos últimos tempos, tem-se verificado um crescente interesse em embalagens alimentares com propriedades deste tipo [4,5,12].

1.2. OBJETIVOS

Com este trabalho de investigação pretendia-se desenvolver filmes compósitos com propriedades antimicrobianas para aplicação em embalagens alimentares. De forma a conferir tais propriedades ao filme de polietileno foram utilizados zeólitos, pertencentes à família faujasite, modificados com um ou uma mistura dos catiões prata, cobre e zinco.

O efeito antimicrobiano dos filmes compósitos, bem como dos zeólitos modificados, foi avaliado utilizando a bactéria gram-negativa *Escherichia coli*, bactéria gram-positiva *Bacillus subtilis* e as leveduras *Candida albicans* e *Saccharomyces cerevisiae* como microrganismos indicadores de sensibilidade. Estes materiais foram ainda caracterizados por uma série de técnicas analíticas, tais como: microscopia eletrónica de varrimento acoplado com energia dispersiva de raios-X, espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier, espectroscopia fotoelectrónica de raios-X, difração de raios-X, e análises químicas.

1.3. ESTRUTURA DA TESE

Esta tese está organizada em 7 capítulos principais onde se descreve o trabalho de investigação realizado. O contexto e âmbito da tese são introduzidos no presente capítulo.

No segundo capítulo - estado da arte - são abordados os fundamentos teóricos associados às embalagens antimicrobianas, zeólitos e iões com propriedades antimicrobianas, necessários à compreensão do trabalho desenvolvido.

No terceiro capítulo - materiais e métodos - são apresentados os procedimentos utilizados para a modificação dos zeólitos com iões metálicos e para a preparação dos filmes compósitos, bem como as técnicas analíticas empregues na sua caracterização. Serão ainda descritos os ensaios de suscetibilidade microbiana realizados a fim de averiguar a atividade antimicrobiana dos materiais preparados.

No quarto capítulo - análise e discussão dos resultados- são incluídos os resultados obtidos ao longo de todo o trabalho experimental, assim como a discussão dos mesmos.

No quinto capítulo - Considerações finais - serão apresentadas as conclusões finais deste trabalho de investigação.

No sexto capítulo - Perspetivas futuras - serão apresentadas sugestões de trabalho futuro.

Por último, no sétimo capítulo - Referências bibliográficas - será apresentada toda a bibliografia utilizada para o desenvolvimento do presente trabalho.

Esta tese de mestrado é o resultado de uma colaboração entre o Centro de Química do Departamento de Química e o Centro de Biologia Molecular e Ambiental do Departamento de Biologia da Universidade do Minho e a Empresa *Amtor Flexibles* Porto do grupo *Amtor* sediada em Vila Nova de Gaia.

Capítulo 2

ESTADO DA ARTE

Neste capítulo será feita uma revisão bibliográfica dos conceitos mais importantes para a compreensão do presente trabalho.

Como já referido, este trabalho tinha como objetivo desenvolver filmes compósitos com propriedades antimicrobianas para aplicação em embalagens alimentares. Neste sentido, será apresentada a problemática da contaminação microbiana de alimentos, assim como a descrição sobre o que são e para que servem as embalagens alimentares antimicrobianas. Serão ainda abordados os materiais utilizados para a obtenção deste tipo de embalagens, nomeadamente polietileno, zeólitos e os iões metálicos prata, cobre e zinco. Por fim, será feita uma revisão sobre os compósitos antimicrobianos e legislação que regula o desenvolvimento de embalagens alimentares.

2.1. CONTAMINAÇÃO MICROBIANA DE ALIMENTOS

Os alimentos são constituídos essencialmente por água, carboidratos, proteínas, ácidos gordos e sais minerais. A sua composição, bem como a presença de condições adequadas de temperatura, pH, entre outros fatores, tornam os alimentos um alvo fácil de contaminação microbiológica [13].

A proliferação de microrganismos nos alimentos é um assunto bastante preocupante para as indústrias alimentares, entidades reguladoras assim como para os consumidores. Devido à larga escala a que os produtos alimentares são produzidos, a sua contaminação resulta em severas perdas económicas para a indústria alimentar, em particular se as matérias-primas apresentarem um valor económico considerável [14,15]. Os métodos tradicionais para a proteção dos alimentos de contaminações microbianas indesejáveis incluem processos térmicos, irradiação, atmosfera modificada, processos químicos, entre outros [7,16]. No que diz respeito às embalagens de atmosfera modificada e com elevada barreira de oxigénio, estas são capazes de inibir o crescimento de microrganismos aeróbios, contudo não conseguem evitar o aparecimento de microrganismos anaérobios facultativos ou obrigatórios que conseguem viver na ausência de oxigénio. O processamento das embalagens com altas temperaturas também pode ajudar no controlo microbiano, porém podem causar efeitos inesperados nas propriedades sensoriais, nutricionais e funcionais dos alimentos. Desta forma as indústrias alimentares começaram a utilizar agentes antimicrobianos com o objetivo de prolongar o tempo de vida dos produtos perecíveis, assim como assegurar a sua qualidade nutricional, frescura e segurança [12,14,15].

Os primeiros procedimentos de utilização de agentes antimicrobianos compreendiam a aplicação direta destes nas formulações alimentares ou, a sua deposição na superfície alimentar por imersão e pulverização. Rapidamente se verificou que a utilização direta de compostos antimicrobianos nos alimentos não seria a solução pretendida pelas indústrias, essencialmente por

três razões [9,17]. Por um lado, como as contaminações microbiológicas dos alimentos ocorrem preferencialmente na sua superfície, a dispersão do agente antimicrobiano por toda a matriz alimentar pode fazer com que não existam concentrações suficientes para inibir o crescimento microbiano à superfície do produto alimentar. Por outro lado, as propriedades físico-químicas dos alimentos podem neutralizar a atividade dos agentes antimicrobianos. Por exemplo, o pH dos alimentos pode influenciar a ionização da maioria dos agentes químicos e, pode mudar a atividade antimicrobiana dos ácidos orgânicos e dos seus sais. Por último, este método pode levar à utilização de quantidades excessivas de aditivos, com principal consequência nas propriedades sensoriais dos alimentos [9,17].

2.2. EMBALAGENS ANTIMICROBIANAS

De forma a ultrapassar as limitações associadas à adição direta de agentes antimicrobianos aos alimentos, tem sido realizado um vasto trabalho de investigação para o desenvolvimento de embalagens poliméricas antimicrobianas [9,11]. Uma embalagem antimicrobiana é um sistema concebido para prolongar a fase latente dos microrganismos de contaminação e patogénicos suscetíveis de proliferar nos produtos alimentares, reduzindo assim o número de microrganismos vivos e as suas taxas de crescimento [6,8,9,11,13]. Diferentes agentes antimicrobianos têm sido incorporados em embalagens alimentares, tais como: ácidos orgânicos (ácido benzóico, sorbatos), enzimas (lisozima, glucose oxidase), bacteriocinas (nisina, pediocina), fungicidas (*benomyl*, imazalil), polímeros (predominantemente quitosano), extratos naturais (Basil), antibióticos, triclosano e compostos de prata [6,18,19]. O desenvolvimento deste tipo de embalagens pode ser conseguido através da incorporação direta nos polímeros de agentes antimicrobianos, voláteis ou não-voláteis; revestimento do agente antimicrobiano à superfície do polímero; imobilização por ligações iónicas ou covalentes e, por último utilização de polímeros inerentemente antimicrobianos [9,20,21].

As embalagens antimicrobianas têm demonstrado grande potencial para controlar o crescimento de organismos patogénicos nos alimentos, tais como: *Lysteria monocytogenes* [13,22,24], *Escherichia coli* O157:H7 [13,22], *Salmonella enterica* [23], *Campylobacter jejuni* [23], *Bacillus subtilis* [24] e *Lactobacillus* [25,26].

2.2.1. CLASSIFICAÇÃO DAS EMBALAGENS

As embalagens alimentares podem ser classificadas essencialmente em dois grupos distintos [6,8,11,18,27]:

- ✓ Embalagens que permitem a difusão do agente antimicrobiano;
- ✓ Embalagens nos quais não há difusão do agente antimicrobiano

As embalagens alimentares que permitem a difusão dos agentes antimicrobianos são aquelas em que estes se encontram incorporados no filme polimérico, ou à sua superfície. A taxa de libertação do agente antimicrobiano é um passo crítico na manutenção da qualidade e segurança dos produtos alimentares [17,27]. A rápida libertação do agente antimicrobiano leva a que este seja consumido rapidamente num curto período de tempo, não sendo mantida a concentração mínima inibitória (MIC) à superfície do produto alimentar. Contudo, se a libertação dos agentes antimicrobianos for realizada de forma muito lenta, pode continuar a ocorrer contaminação à superfície do alimento. Assim, é importante que haja uma libertação controlada do agente antimicrobiano, para que a sua atividade se mantenha durante o período de armazenamento do produto [6,8,17].

Os estudos realizados com o intuito de controlar a libertação dos agentes antimicrobianos baseiam-se essencialmente na alteração da estrutura dos filmes. Vários autores tentaram controlar a libertação de agentes ativos pela utilização de um filme com três camadas [28-30]. A primeira camada (camada exterior) tinha como função prevenir a migração do agente para o ambiente, a segunda camada era aquela onde estava incorporado o agente ativo e a terceira camada controlava a difusão do agente para a superfície do alimento. O grupo de G.G.Buonocore [29] também estudou o efeito da alteração das ligações cruzadas entre as camadas poliméricas na taxa de libertação do agente antimicrobiano. Numa perspetiva diferente, S. M. Iconomopoulou *et al.* [31] sugeriram controlar a libertação de triclosano através da alteração da orientação molecular das cadeias poliméricas de polietileno de elevada densidade (HDPE). D. Guzey *et al.* [32] propuseram que a libertação de agentes antimicrobianos podia ser controlada através da utilização de cápsulas de dimensão micro e nano e fazendo variar condições como pH, temperatura e força iónica do meio. Seyhun Gemili *et al.* [33] tentaram controlar a libertação de lisozima através da variação do tamanho dos poros de um filme de acetato de celulose.

Na figura 2.1 encontra-se uma representação esquemática das embalagens em que há difusão do agente ativo (situação A, B e C). A situação (A) represente um sistema de embalagem constituído

por uma única camada de filme polimérico que contém o agente antimicrobiano, (B) representa o mesmo conceito mas com um filme interior a controlar a libertação do composto antimicrobiano e (C) consiste no revestimento do filme polimérico com uma formulação contendo o agente antimicrobiano [17].

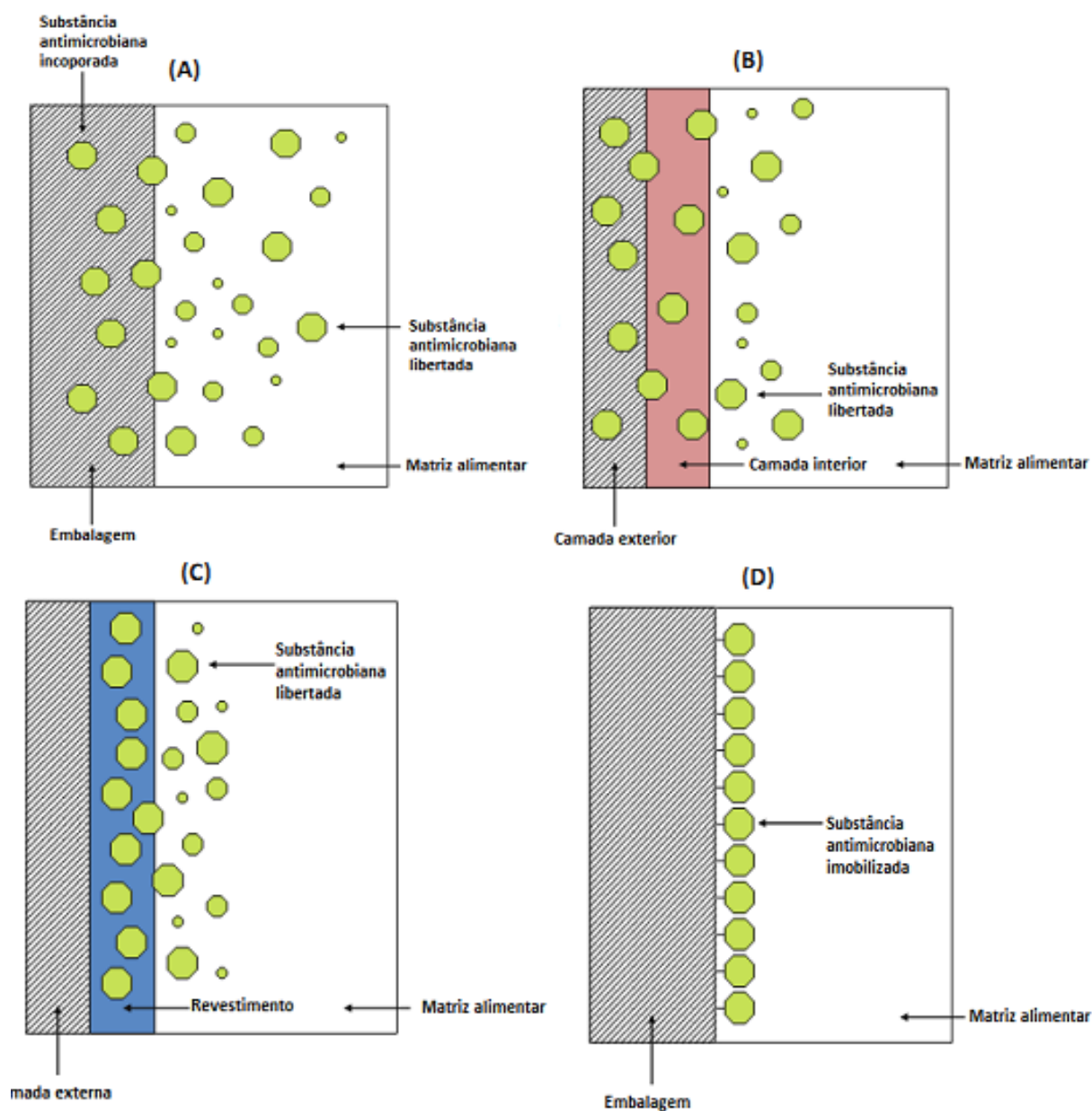


Figura 2.1. Sistemas de embalagens antimicrobianas. (Modificado de [17])

As embalagens alimentares em que não se verifica o fenómeno de migração são aquelas em que os agentes antimicrobianos se encontram imobilizados no filme polimérico. Neste tipo de embalagens, os agentes antimicrobianos só exercem a sua função quando entram em contato com a superfície do alimento. O processo de imobilização é feito através de ligações iónicas ou covalentes e

apenas ocorre se o agente antimicrobiano e o polímero utilizado possuírem grupos funcionais. Exemplos de agentes antimicrobianos com grupos funcionais são os péptidos, enzimas, poliamidas e ácidos orgânicos [6,20]. A condição D da figura 2.1 representa este tipo de embalagens [17].

2.2.2. POLÍMEROS

O metal, a cerâmica (vidro) e o papel (cartão) foram dos materiais mais utilizados em embalagens alimentares na antiguidade [3]. Embora estes ainda sejam utilizados, os materiais poliméricos conseguiram impor-se na indústria alimentar por apresentarem propriedades vantajosas como: baixo peso molecular, baixo custo, facilidade de processamento e variabilidade de propriedades físicas [3,12]. Apesar de cada vez mais se ter em atenção os níveis de poluição ambiental, a utilização em embalagens alimentares de polímeros derivados de petróleo como polipropileno (PP), polietileno (PE), poliestireno (PS), poliamida (PA), poli (vinil cloreto) (PVC), poli(vinil álcool) (PVA), entre outros, continua a ser bastante superior à dos biopolímeros - polímeros biodegradáveis derivados de fontes naturais como polissacarídeos, proteínas e lípidos [34-36]. Apesar dos biopolímeros não serem problemáticos em termos ambientais, a sua utilização na indústria tem sido bastante limitada por problemas relacionados com fracas propriedades de barreira (oxigénio e humidade), baixas propriedades mecânicas e brilho inerente ao material [35-37].

A possibilidade de encontrar polímeros que cumpram todas as propriedades mecânicas e de barreira (oxigénio, dióxido de carbono, humidade) desejáveis para o desenvolvimento de uma embalagem é reduzida. Como tal, têm sido aplicados complexos filmes em multicamadas. Por exemplo, numa situação em que é necessário uma elevada barreira de oxigénio perante condições extremas de humidade, pode ser incluído um polímero com elevada barreira de oxigénio, como o álcool de etileno-vinil (EVOH), entre dois filmes hidrofóbicos como o polietileno [3]. A utilização de complexos multicamadas tem como desvantagens os custos de produção, a utilização de aditivos e adesivos e também a dificuldade de reciclagem. Como consequência, nos últimos anos tem-se gerado um crescente interesse no desenvolvimento de materiais compósitos poliméricos, cujas propriedades resultam de reações sinérgicas entre os seus componentes [3, 35, 38,39].

Os compósitos poliméricos derivam do reforço do polímero com materiais orgânicos ou inorgânicos de geometrias definidas (fibras, esferas, partículas). Diferentes tipos de materiais inorgânicos têm sido utilizados como reforço nas matrizes poliméricas, como por exemplo as argilas, as microesferas de cerâmica e, particularmente as partículas de sílica. Um exemplo dessas partículas de sílica são os zeólitos [35].

Tendo em consideração as propriedades melhoradas obtidas através da formação de compósitos, o reforço de polímeros derivados do petróleo com materiais que apresentem

propriedades catalíticas pode levar a que haja aumento da sua degradabilidade. Isabel C. Neves *et al.* [40] estudou a degradação de HDPE através da incorporação de diferentes zeólitos, tais como: zeólito Y ultra - estável (USY) e três zeólitos Y desaluminados (HY(4), HY(12) e HY(20)). Entre os vários zeólitos Y, usados na mesma quantidade, HY (20) foi aquele que apresentou maior efeito na degradação catalítica do polímero.

2.2.2.1. POLIETILENO

As poliolefinas, em particular o polietileno, são polímeros bastante importantes a nível industrial, comercial e científico [41].

O polietileno consiste numa resina de etileno polimerizado, cuja unidade de repetição se encontra representada na figura 2.2. Este polímero é classificado em diferentes categorias segundo a sua densidade e ramificação, em polietileno de elevada densidade (HDPE), polietileno de baixa densidade (LDPE) e polietileno linear e de baixa densidade (LLDPE) (Figura 2.3) [42,43].

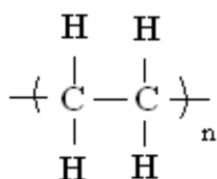


Figura 2.2. Unidade de repetição do polietileno [42].

O Polietileno ramificado (ou LDPE) foi uma das primeiras poliolefinas a ser produzida através da polimerização de radicais livres de etileno, em condições de elevada temperatura e pressão. Este polímero apresenta uma densidade de 0,910-0,925 g/cm³. Por sua vez, o desenvolvimento de processos de baixa pressão e temperatura, assim como a utilização de agentes catalisadores altamente ativos, resultou na produção de polietileno linear (HDPE) com uma densidade de aproximadamente 0,960 g/cm³. Por último, o LLDPE resultou da introdução de ramificações na cadeia do etileno derivadas da produção de co-polímeros de etileno com pequenas quantidades de α -olefina. LLDPE apresenta uma densidade de 0,918-0,940 g/cm³ [43].

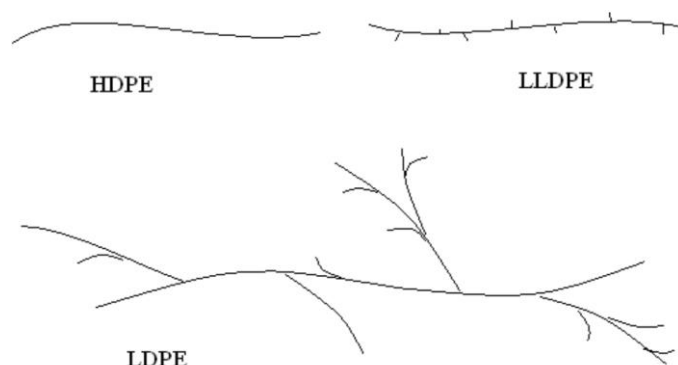


Figura 2.3. Diferentes categorias de polietileno: HDPE, LDPE e LLDPE [43].

No que diz respeito a aplicação do polietileno em embalagens alimentares com propriedades antimicrobianas, o LDPE tem sido o mais utilizado devido à sua flexibilidade, transparência, facilidade de processamento, estabilidade térmica e custo [9]. Compostos de sorbato [44], nisina [45], triclosano [31], nanopartículas de óxido de zinco [13], basil [46], *linalool* [47] são alguns exemplos dos agentes antimicrobianos que já foram incorporados em LDPE.

2.3. ZEÓLITOS

Os zeólitos pertencem à classe dos sólidos porosos reconhecidos pelas suas capacidades de interagirem com átomos, iões e moléculas não só na sua superfície mas também no seu interior [48].

O primeiro zeólito natural, a estilbite, foi descoberto em rochas pertos de vulcões ativos ou já extintos pelo mineralogista sueco *Crönstedt* em 1756. Este zeólito libertava água quando aquecido, dando a ideia de estar em fusão. Este aspeto levou à conjugação das palavras gregas "zeo" (incandescente) e "lithos" (pedra) que resultou no aparecimento da designação "zeólito" [49-51].

Apesar da existência de vários zeólitos naturais, entre 1949 e 1954, a *Union Carbide* produziu os primeiros zeólitos totalmente sintéticos - zeólitos A, X e Y. A síntese destes zeólitos revelou-se bastante importante na medida em que permitia a otimização do material para determinada função, contrariando as impurezas e a grande variabilidade de composição dos zeólitos naturais. Durante a síntese dos zeólitos existem aspetos estruturais como a razão Si/Al, tamanho do poro e densidade da rede (número de átomos por célula unitária) que podem ser alterados [49,50]. Atualmente, existem cerca de 40 tipos diferentes de zeólitos naturais e 150 produzidos sinteticamente [52].

Desde a sua descoberta, os zeólitos têm sido reconhecidos por vários autores pelas suas excelentes propriedades físicas e químicas que incluem elevada área superficial, estrutura porosa, elevada capacidade de adsorção e permuta iónica, resistência térmica, inércia química e toxicidade

baixa ou inexistente [50,51,53,54-59]. Estes materiais têm sido amplamente aplicados como catalisadores heterogêneos de reações químicas em refinarias, indústrias petroquímicas e químicas, na agricultura (fertilizantes, rações alimentares e desodorização dos estábulos dos animais), em detergentes (para remoção de fosfato), no controlo de emissões, degradação catalítica de poluentes e na remoção por permuta iónica de radioisótopos presentes em águas de centrais nucleares e efluentes industriais. [49,50,53,60]

2.3.1. ESTRUTURA DOS ZEÓLITOS

Os zeólitos naturais e sintéticos são aluminossilicatos cristalinos com uma estrutura sólida bem definida, caracterizada pela presença de um sistema de poros que permite alojar de forma seletiva compostos ativos [55,61-64]. A estrutura destes aluminossilicatos é baseada num arranjo tridimensional de tetraedros TO_4 (unidades primárias dos zeólitos), onde T é um átomo de silício ou alumínio coordenado por quatro átomos de oxigénio (Figura 2.4).

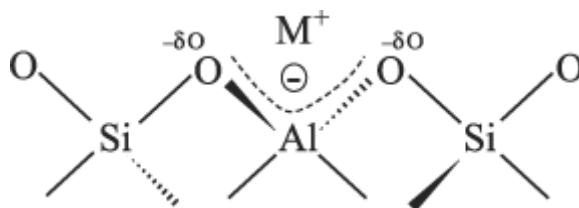


Figura 2.4. Arranjo tridimensional dos tetraedros TO_4 (em que T é Al ou Si) na estrutura cristalina dos zeólitos [65].

A estrutura contínua destes materiais resulta da conexão existente entre os tetraedros SiO_4 e AlO_4^- estabelecida pelos átomos de oxigénio, denominada por unidades secundárias do zeólito. Existe uma multiplicidade de arranjos cristalinos formados a partir destes tetraedros, encontrando-se estes catalogados pela *International Zeolite Association* (IZA), associação reconhecida pela IUPAC que regula e atribui a nomenclatura das estruturas zeolíticas conhecidas segundo um código de 3 letras maiúsculas [50,66,67].

A presença de alumínio na rede cristalina dos zeólitos resulta num défice de carga, a qual pode ser compensada pela introdução de catiões de metais alcalinos e alcalino-terrosos, tais como Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , entre outros. Estes catiões conferem aos zeólitos a capacidade de permuta iónica em solução aquosa, visto que não se ligam covalentemente à estrutura o que lhes confere mobilidade [50,62,63,65-67].

Estas estruturas microporosas são normalmente caracterizadas pelo tamanho do anel que define o poro, usualmente designado por n-anel, onde n é número de átomos T presentes no mesmo.

Existem zeólitos de poros pequenos – 8-anel com diâmetros livres de 0,30 a 0,45 nm (zeólito A); poros intermédios – 10-anel e diâmetros livres de 0,45 a 0,60 nm (ZSM5) e poros largos – 12-anel e diâmetro de 0,60 a 0,80 nm (zeólito X e Y) [51,53].

A composição química da malha elementar dos zeólitos é normalmente representada em função do teor em óxidos de silício e alumínio. Esta tem como fórmula geral $M_{2/n}O \cdot Al_2O_3 \cdot zSiO_2$, onde n é a valência do catião M e z pode variar entre 1 e infinito, já que, segundo a regra de Loewenstein os átomos de alumínio não podem ser adjacentes (não existe Al-O-Al na rede). Assim, esta regra estabelece que o valor mínimo da razão Si/Al é ≥ 1 , ou seja é o caso limite em que todos os tetraedros SiO_4 se encontram individualmente ligados a tetraedros de AlO_4^- , não existindo um limite máximo definido para o valor de Si/Al [51,67,68]. A variação da razão Si/Al de um zeólito pode levar a alteração da sua acidez, sendo que quanto maior a razão Si/Al maior a força dos centros ácidos [68-70].

Neste trabalho foram utilizados dois análogos pertencentes à família faujasite correspondente ao código de 3 letras FAU, nomeadamente zeólito Y e X [71].

2.3.1.1. ZEÓLITOS FAU

Os zeólitos FAU possuem um sistema de canais tridimensional baseado em 8 cavidades sodalite interligadas por pontes de hidrogénio entre as 6 fases hexagonais. Além das cavidades sodalites estas estruturas são compostas por 16 prismas hexagonais e 8 supercavidades, as quais estão representadas na figura 2.5 [52,72]. Os catiões introduzidos na faujasite a fim de compensar a carga negativa da rede estão localizados em posições discretas nos prismas hexagonais (sítio I), nas cavidades sodalites (sítios I' e II') e nas supercavidades (sítios II e III). Esta localização depende do tipo e quantidade do catião e do seu estado de hidratação [72]

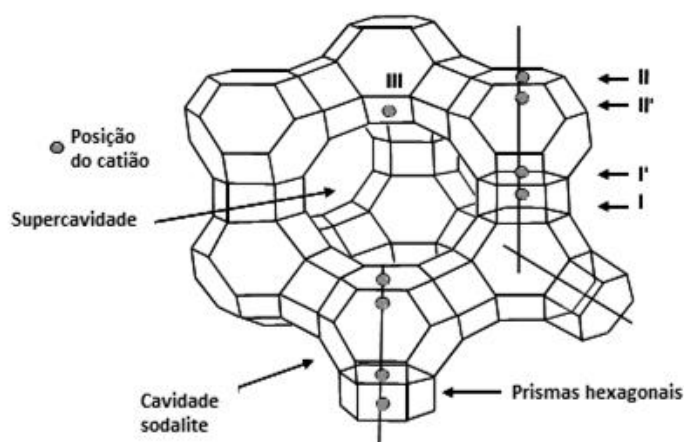


Figura 2.5. Estrutura porosa FAU com representação da supercavidade, cavidade sodalite, dos duplos prismas hexagonais assim como os locais preferenciais de permuta em cada cavidade. Modificado de [72]

As cavidades sodalites encontram-se ligadas às supercavidades por anéis de 4 e 6 tetraedros. A supercavidade central apresenta quatro aberturas com uma dimensão do anel de 12 átomos T. Os prismas hexagonais, cavidades sodalites e supercavidades apresentam um diâmetro interno de 0,26 nm; 0,6 nm; e 1,25 nm, respectivamente (Figura 2.6) [49,52,72].

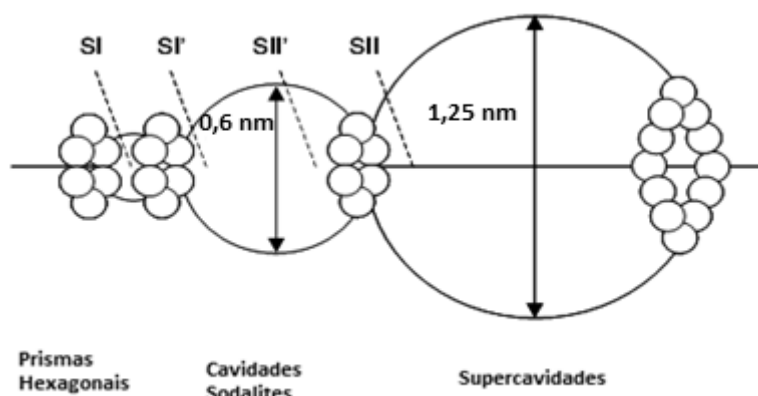


Figura 2.6. Diâmetros das cavidades presentes na estrutura FAU. Modificado de [72]

A célula unitária destes zeólitos compreende 192 unidades tetraédricas e a sua fórmula química geral é $[(Ca,Mg,Na_2)_{29}(H_2O)_{240}][Al_{58}Si_{134}O_{384}]$ [49]. O zeólito FAU possui dois análogos sintéticos que diferem entre si na razão Si/Al: Y ($Si/Al \geq 2,5$) e X ($1 \leq Si/Al \leq 1,5$). A sua baixa razão Si/Al antevê uma grande capacidade de permuta iônica [69,73].

2.3.2. ZEÓLITOS COMO AGENTES ANTIMICROBIANOS

Num ambiente industrial, a incorporação de agentes antimicrobianos em polímeros pode compreender a utilização de processos térmicos como fusão, extrusão e injeção por molde [74]. De acordo com a literatura, existem poucos estudos que envolvam o desenvolvimento de filmes antimicrobianos através destes métodos, uma vez que as elevadas temperaturas aplicadas podem afetar a estabilidade química e reduzir a atividade dos agentes antimicrobianos [21,75]. Tal, está relacionado com a baixa estabilidade térmica apresentada por alguns agentes antimicrobianos, principalmente pelos materiais orgânicos. Nestes casos a preparação do filme antimicrobiano é realizada através da dispersão do polímero numa solução à qual é adicionado o agente antimicrobiano sob agitação [9,21,74].

Diversos estudos têm demonstrado que o uso de materiais inorgânicos antimicrobianos apresenta importantes vantagens, uma vez que possuem maior estabilidade, resistência térmica e segurança de manuseamento [76-79].

A utilização de zeólitos como composto inorgânico recetor de metais de transição com atividade antimicrobiana, tem sido possível devido à grande capacidade de permuta iónica destas estruturas. As grandes vantagens da utilização destes materiais são a adsorção, armazenamento e libertação de forma gradual dos metais de transição [79-83].

Prata, cobre e zinco são os metais de transição utilizados neste trabalho.

2.3.2.1. PRATA

De entre os catiões metálicos existentes, os iões prata são os mais reconhecidos pelas suas propriedades antimicrobianas, visto que são relativamente inertes e seguros, apresentam baixa citotoxicidade para as células animais, elevada estabilidade térmica e baixa volatilidade [78,79,82,84]. Estudos demonstraram que a prata iónica (Ag^+) apresenta elevada citotoxicidade para bactérias gram-positiva e gram-negativa, sendo esta inferior para células eucarióticas [81,84-89]

O mecanismo de ação antibacteriano dos iões prata está relacionado com a sua interação com o grupo tiol (-SH) das cisteínas que normalmente existem na membrana celular das bactérias [84,90,91]. Estudos realizados demonstraram que os iões prata podem reagir com a cisteína substituindo o seu átomo de hidrogénio por um complexo S-Ag, afetando a estrutura das enzimas ligadas à membrana, tal como as enzimas da cadeia respiratória [92,93]. A inativação destas enzimas interrompe o processo respiratório e leva à formação de espécies reativas de oxigénio (ROS), com papel importante na morte da bactéria, devido à condição de stresse que esta foi sujeita. Os iões prata também previnem a replicação de DNA e são fotoativos na presença de radiação ultravioleta A e C, levando à inativação de bactérias e vírus [94]. Na figura 2.7, encontram-se esquematizados os vários mecanismos da atividade antibacteriana dos iões prata, após a sua libertação de estruturas como os zeólitos [95].

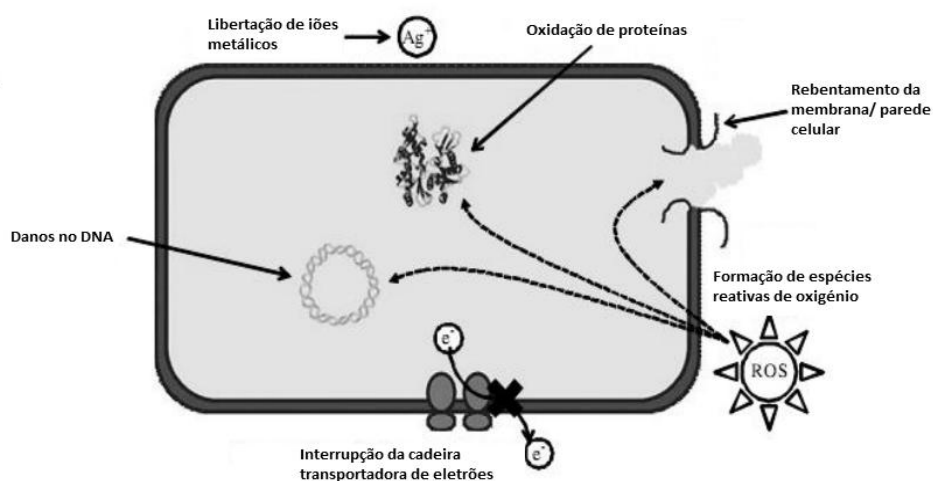


Figura 2.7. Mecanismos de atividade antimicrobiana dos iões prata em bactérias. [95].

Alguns estudos têm referido que não só a prata iónica pode ser usada com o propósito de desinfecção, mas também a prata metálica (Ag^0) [80,84]. Quando Ag^0 é exposta a ambientes aquosos, são produzidas e libertadas espécies de Ag^+ que vão exercer atividade antimicrobiana. Desta forma, o mecanismo de ação antimicrobiano da Ag^0 tem sido considerado idêntico ao da Ag^+ [80,84].

Atualmente, os iões prata têm sido utilizados para controlar o crescimento microbiano numa variedade de aplicações médicas, incluindo trabalho dentário, catéteres e tratamento de queimaduras, embalagens alimentares, assim como em sistemas de purificação para desinfecção de água/ar e em indústrias têxteis [88,90].

Existem algumas desvantagens associadas à utilização de iões prata como agente antimicrobiano: custo superior em comparação com outros iões metálicos como zinco e cobre, baixa estabilidade em soluções aquosas e tendência a reduzir-se a prata metálica após exposição à luz ou calor e formação de compostos insolúveis quando reage com Cl^- , HS^- , SO_4^{2-} , H_2S e outros aniões existentes na água com consequente perda de atividade antimicrobiana [96].

Um dos estudos mais citado nesta área, publicado por M. Rivera-Garza *et al.* [96], consistiu na caracterização e avaliação da atividade antibacteriana do zeólito natural Clinoptilolite permutado com prata utilizando *Escherichia coli* (*E. coli*) e *Streptococcus faecalis* (*S. faecalis*) como microrganismos indicadores de sensibilidade. O sucesso da atividade antibacteriana destes materiais estava dependente da quantidade de zeólito utilizado (2,5 mg, 5 mg, 10 mg), quantidade de prata permutada (A, 2A, 5A, 24A - representação da quantidade de prata neste estudo, sendo A a menor e 24A a maior) e do tempo de contacto com os microrganismos. De uma forma geral, os resultados obtidos demonstraram que para a inibição do crescimento de *E. coli* era necessário pelo menos duas horas de contacto com 2,5 mg de zeólito com uma concentração de prata de 5A, sendo necessário no caso da *S. faecalis* um contacto de 6 horas com uma concentração de prata de 24A para se obter os mesmos resultados [96].

Num estudo realizado por Bright Kwakye-Awuah *et al.* (2008) [97] foi utilizado o zeólito sintético X permutado com uma solução de nitrato de prata 0,5 M. *E. coli*, *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) e *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*) mostraram-se sensíveis à ação antimicrobiana deste zeólito após uma hora [97].

Um estudo mais recente realizado por Violeta Elena Copcia *et al.* [98], pretendeu estimar a actividade antibacteriana do zeólito natural clinoptilolite permutado com uma solução nitrato de prata 0,1 M. De forma a melhorar a capacidade de permuta iónica da clinoptilolite, esta estrutura foi sujeita a um tratamento com ácido oxálico 1 M e a outro com hidróxido de sódio 1 M, tendo-se verificado que quer o crescimento de bactéria gram-negativa *E. coli*, quer o da gram-positiva *S. aureus* foi inibido a partir de uma concentração de 2 mg/mL de meio de cultura. Além disso,

verificaram que a clinoptilolite tratada com ácido exibia uma actividade antibacteriana mais forte contra *E.coli*, enquanto que a amostra tratada com hidróxido de sódio exibia o mesmo tipo de resultado na presença de *S. aureus* [98].

2.3.2.2. COBRE

Os iões cobre (Cu^{2+}) desempenham funções importantes nos organismos vivos, visto que são necessários em baixas concentrações como cofator de metaloproteínas e enzimas. Apesar deste ião ser considerado seguro para os humanos, em elevadas concentrações é capaz de inibir o crescimento de bactérias e tem um efeito tóxico para a maioria dos microrganismos [24,99-103].

O mecanismo de ação antimicrobiana dos iões Cu^{2+} está relacionado com as interações eletrostáticas que estes podem estabelecer com a membrana celular dos microrganismos. Estas interações permitem-lhes penetrar no interior da membrana celular através de canais iónicos, alterando a permeabilidade da mesma. Como consequência ocorre perda de iões intracelulares tais como os iões K^+ , que funcionam como indicadores de danos na bactéria, e metabolitos de baixo peso molecular. Ao penetrarem no interior da célula, os iões cobre podem ainda substituir iões essenciais, bloquear grupos funcionais de proteínas, inativar enzimas e levar à consequente produção de ROS que possuem um papel importante na morte da bactéria [100,102]. Atualmente, os iões cobre têm sido utilizados em sistemas de purificação para desinfeção de água/ar e em indústrias têxteis [103].

A principal desvantagem associada à utilização deste ião como agente antibacteriano no tratamento de água encontra-se relacionada com a sua dificuldade em interagir com as bactérias presentes em ambientes aquáticos [96,100,101]. Comparado com a prata, a atividade biocidal do cobre é mais baixa sendo necessário, por exemplo, utilizar 10 mg Cu^{2+} /Kg para que este exiba a sua atividade em água, enquanto que a prata exerce entre os 50-100 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ [84].

Ayben Top *et al.* [81] avaliaram a atividade antibacteriana do zeólito natural clinoptilolite (NC) permutado com soluções de nitrato de prata, nitrato de cobre e nitrato de zinco 0,01 M, utilizando as bactérias *P. aeruginosa* e *E. coli* como microrganismos indicadores de sensibilidade. Através do teste de suscetibilidade por difusão em placa, puderam observar que NC por si só não possui qualquer atividade antibacteriana. Além disso, verificaram que NC permutada com prata foi mais eficiente na inibição do crescimento bacteriano dos dois microrganismos testados, em comparação com o zeólito permutado com cobre e zinco [81].

2.3.2.3. ZINCO

O zinco (Zn^{2+}), à semelhança dos iões cobre, desempenha funções bastante importantes no organismo humano, já que está associado à função e estrutura de inúmeras macromoléculas presentes no nosso organismo e é essencial a mais de 300 processos enzimáticos, entre os quais a regulação do crescimento ósseo e replicação de DNA [103].

Relativamente à possível aplicação deste ião em desinfecção bacteriana, a maioria dos estudos realizados utilizam-no na forma de nanopartículas de óxidos de zinco [13,104,105] ou então permutado em combinação com outros iões em zeólitos [22,106]. Os óxidos de zinco têm sido frequentemente utilizados em superfícies de contato com os alimentos. Estes decompõem-se a Zn^{2+} após entrar no organismo humano [13].

Um estudo realizado por Kateřina Malachová *et al.* [93] avaliou as diferenças no comportamento antimicrobiano dos iões prata, cobre e zinco em organismos procariontes (bactérias) e organismos eucariontes (leveduras). Para tal, estes iões foram permutados na argila montmorillonite e as suas propriedades antimicrobianas foram avaliadas utilizando as leveduras *Pycnoporus cinnabarinus* e *Pleurotus ostreatus* e a bactéria *E. coli* como microrganismos indicadores de sensibilidade. Os resultados obtidos demonstraram que *E. coli* foi bastante mais suscetível à ação da prata (tal como demonstrado pelo estudo de Ayben Top *et al.* [81]), enquanto as leveduras demonstraram-se bastante mais sensíveis à ação antimicrobiana dos iões zinco e cobre. Enquanto baixas concentrações de cobre e zinco são necessárias para o crescimento das leveduras, a prata não pertence ao grupo dos elementos essenciais. Este facto pode explicar as diferenças entre a capacidade dos iões prata, cobre e zinco penetrarem nas células fúngicas. Os iões cobre e zinco são transportados para o interior das leveduras onde podem acumular e exercer efeitos tóxicos a elevadas concentrações [93].

2.3.3. PREPARAÇÃO DE ZEÓLITOS MODIFICADOS COM IÕES METÁLICOS

A modificação de zeólitos com diferentes metais tem sido de grande interesse nos últimos anos, tanto a nível académico como a nível industrial, nas áreas farmacêuticas, alimentar, plásticos e de revestimentos [107]. A introdução de metais nas estruturas dos zeólitos pode ser feita essencialmente por dois processos: permuta iónica e impregnação [108-110]

De forma sucinta, o processo de permuta iónica consiste na imersão dos zeólitos numa solução aquosa contendo o catião de interesse, sendo este procedimento facilitado através de aquecimento e de agitação. Após a separação do sólido, este é extensivamente lavado com água a fim de remover o excesso de sal da solução localizado nos poros dos zeólitos. Apesar de a permuta iónica ser o

método mais utilizado, existem situações em que este não é efetivo e não promove a permuta de quantidades suficientes do metal. Estas situações incluem os zeólitos com baixa capacidade de permuta iónica (zeólitos com elevada razão Si/Al) e a utilização de complexos metálicos com carga neutra ou negativa. Nestes casos, o procedimento de impregnação é preferível para se atingirem os valores desejados de metal [110,111].

Por sua vez, a impregnação consiste em colocar as estruturas zeolíticas em contacto com uma solução aquosa contendo o catião que se pretende depositar à sua superfície [110,111]. Existem cerca de oito métodos que permitem realizar a impregnação, sendo mais usual utilizar a impregnação por imersão e a impregnação húmida incipiente [111]. Na impregnação por imersão a deposição do catião de interesse no zeólito ocorre de forma lenta, demorando horas ou mesmo dias, permitindo desta forma uma boa dispersão dos catiões pela superfície externa e interna da estrutura zeolítica. No final do processo o excesso de solvente é eliminado por evaporação ou por escoamento. Na impregnação incipiente, o zeólito é adicionado a uma solução aquosa contendo uma concentração conhecida do catião de interesse, sendo o volume impregnado igual ao volume dos poros do material [110,111].

A preparação de zeólitos contendo dois ou mais metais apresenta outro nível de complexidade associado à obtenção de *clusters* bimetalíticos homogéneos e, no controlo da razão entre os dois metais. No caso de zeólitos com elevado conteúdo de alumínio a permuta iónica pode ser realizada em simultâneo ou por fases [110]. Maksod *et al.* [112] permutaram os zeólitos FAU e *Linde type A* (LTA) com soluções de nitrato de cobre e sulfato de níquel com diferentes concentrações em simultâneo. Estes materiais foram preparados para estudar o processo de hidrogenação de p-nitrofenol a p-aminofenol [112]. Em zeólitos com elevado conteúdo de silício, os quais possuem baixa capacidade de permuta iónica, a permuta iónica é mais competitiva e é mais difícil controlar a razão final entre os metais [110].

Neste trabalho, a preparação dos zeólitos bimetalíticos foi realizada por fases. A maioria dos estudos realizados com complexos bimetalíticos utiliza zeólitos comerciais como o *Aglon*, constituído por 2,5% de prata e 14% de zinco. Contudo, não se sabe de que forma é que estes materiais são preparados [23,106].

2.4. COMPÓSITOS ANTIMICROBIANOS

A incorporação de zeólitos modificados com iões, como agentes antimicrobianos, em matrizes poliméricas tem sido extensivamente estudada em vários campos tecnológicos, tais como: tratamento de águas, embalagens alimentares, equipamentos hospitalares, embalagens médicas, cosméticos, entre outros [107,113].

Relativamente à área médica, Daniela Zampino *et al.* [113] com o objetivo de prevenir a colonização bacteriana em superfícies poliméricas de produtos médicos, prepararam filmes compósitos de PVC. Estes foram obtidos pela mistura de *pellets* de PVC com 2 a 20 % (p/p) de zeólito modificado com prata (vendido comercialmente pela *Aglon*), num misturador mecânico a 140°C. Os resultados obtidos demonstraram que a adição de zeólito não afetou as propriedades mecânicas e térmicas de PVC, mesmo perante elevadas quantidades de zeólito (20% (p/p)). A atividade antimicrobiana destes materiais foi avaliada em meios de cultura como *tripticase soy agar* (TSA), tripticase soy broth (TSB) e urina estéril inoculados com *E. coli* e *Staphylococcus epidermidis* (*S. epidermis*). Em todos os meios de cultura usados, PVC contendo 20 % (p/p) de Aglon foi a amostra que demonstrou melhor atividade antimicrobiana. Na urina, verificou-se a redução significativa do crescimento das duas estirpes a partir de 24 horas, havendo inibição de *E. coli* até 20 dias e de *S. epidermis* até 5 dias [113]. Estudos similares foram realizados utilizando o polímero poliuretano [114,115]

No que diz respeito às embalagens alimentares, os zeólitos modificados com iões metálicos são normalmente incorporado nos filmes polímeros nas percentagens de 1, 3 e 5 % (p/p). Devido ao custo de produção destes materiais, normalmente eles são laminados como uma camada fina co-extrudada de espessura 3-5 μm e revestidos com outros filmes (figura 2.8) [11,116].

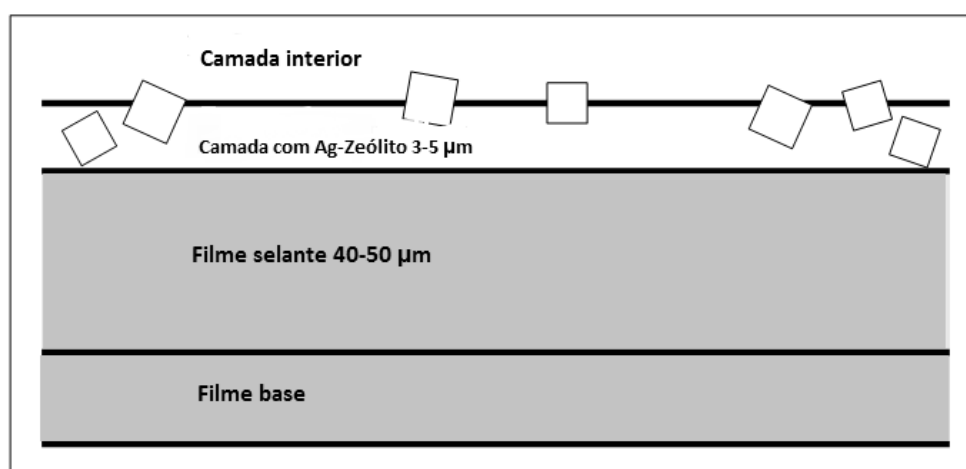


Figura 2.8. Estrutura do filme laminado com Ag-zeólito [116].

H. Pehlivan *et al.* [117] estudou os efeitos da incorporação de diferentes concentrações de zeólito puro e modificado com prata (Ag-zeólito) em filmes compósitos de PP, nas propriedades térmicas, estruturais e mecânicas dos compósitos. As diferentes concentrações de Ag-zeólito foram obtidas através da utilização de soluções de nitrato de prata entre os 5 e 5000 ppm. Os compósitos poliméricos foram preparados pelo processo de extrusão a uma temperatura de 200 °C, sendo necessário a adição de um agente dispersante para a boa dispersão de zeólito. Os resultados obtidos demonstraram que as condições ótimas para a preparação dos filmes compósitos era a incorporação de 2-4 % (p/p) de zeólito modificado com uma concentração de 4,36 mg Ag/g zeólito. A incorporação de elevadas quantidades de zeólito tornava o filme quebradiço, enquanto a utilização de elevadas quantidades de prata levavam a uma taxa de degradação de PP bastante mais rápida comparativamente à de PP puro [117]. Neste estudo não foi feita a caracterização das propriedades antimicrobianas dos materiais preparados, contudo pelos estudos anteriormente apresentados é evidente que os zeólitos modificados com iões metálicos conferem propriedades antimicrobianas aos filmes poliméricos.

A maioria dos estudos realizados com o propósito de desenvolver embalagens poliméricas com propriedades antimicrobianas utilizaram os zeólitos comerciais *Zeomic* e *Aglon* [23,118,119]. Estes materiais foram obtidos através da permuta do zeólito A, pertencente à estrutura *LTA*, com os iões prata e zinco [84,118-121]. Desta forma, neste trabalho foi avaliada a capacidade do zeólito do tipo FAU ser utilizado como agente inorgânico recetor de iões com propriedades antimicrobianas, tais como prata, cobre e zinco, em embalagens alimentares.

2.5. LEGISLAÇÃO

O desenvolvimento de embalagens cada vez mais sofisticadas e eficazes na proteção de produtos alimentares tem trazido novos desafios no que diz respeito à avaliação da sua segurança, em comparação com as embalagens tradicionais. Neste sentido e pensando sempre na segurança do consumidor, a Comissão Europeia através da diretiva EC 1935/2004 ofereceu a oportunidade das embalagens ativas serem introduzidas na Europa. Esta diretiva permitia a aplicação de componentes com capacidade de migração em materiais e objetos em contato com os alimentos. A nova legislação veio colmatar as diferenças entre o mercado Europeu e o mercado do Japão, Estados Unidos da América e Austrália, onde regulamentação mais adequada e flexível permitiu nos últimos anos inovações tecnológicas no sector das embalagens alimentares [2,4,8,122].

Nos Estados Unidos a entidade *Food and Drug Administration (FDA)* já aprovou cinco zeólitos modificados com prata que podem entrar em contacto com os alimentos, tais como: *Zeomic*, *Apacider*, *Aglon*, *Bactekiller* e *Novaron* [3,11,20,118,120].

A entidade Europeia de Segurança alimentar (*EFSA-European Food Safety Authority*) foi solicitada pela Comissão Europeia a fornecer um parecer científico sobre os potenciais riscos dos componentes incorporados em embalagens alimentares. Esta agência deu um parecer positivo sobre a utilização de zeólitos modificados com iões prata em superfícies de contacto com os alimentos. O zeólito *Aglon* foi um dos zeólitos que recebeu aprovação em 2005 [20,84,121]. Na Europa, a migração de prata nas matrizes alimentares é altamente restrita, uma vez que só são autorizadas 50 $\mu\text{g Ag}^+/\text{Kg}$ de alimento. As companhias que pretendem comercializar polímeros para contacto com alimentos são obrigadas a provar que os materiais contendo prata não possuem qualquer efeito negativo nos alimentos [84,118,121].

Durante a avaliação da atividade antimicrobiana das embalagens alimentares é importante investigar a migração dos aditivos antimicrobianos através das embalagens. A diretiva EU 10/2011 emitida em 14 Janeiro é a última diretiva com as regras específicas do uso de materiais plásticos em contacto com os alimentos. Esta estabelece que tais materiais plásticos não devem transferir os seus constituintes para simuladores alimentares em quantidades que excedam 10 miligramas por dm^2 da superfície de contacto do alimento. No que diz respeito aos alimentos destinados às crianças, a transferência não deve ser superior a 60 mg dos constituintes totais por kg de simulador. Os simuladores utilizados dependem do tipo de alimento e, normalmente, é utilizado etanol em diferentes percentagens (10,20 e 50 % (v/v)), ácido acético e óleos vegetais [123].

Capítulo 3

MATERIAIS E MÉTODOS

No presente capítulo serão apresentados os materiais e reagentes utilizados na permuta iónica do zeólito Y com diferentes metais de transição e preparação dos filmes compósitos, assim como a descrição dos respetivos procedimentos. Posteriormente, serão descritos os fundamentos teóricos e condições instrumentais das diferentes técnicas analíticas utilizadas na caracterização dos materiais preparados. Por último, serão apresentados os ensaios de suscetibilidade microbiana realizados a fim de avaliar a atividade antimicrobiana dos materiais preparados (zeólitos e filmes compósitos).

3.1. MATERIAIS E REAGENTES

3.1.1. MATERIAIS

Numa primeira etapa deste trabalho experimental, foram utilizados os zeólitos AgX e AgY (Zeólito NaX e NaY, pertencentes à família FAU, após permuta iónica com prata) preparados no decorrer do projeto de licenciatura [124] para validar qual dos análogos desta estrutura seria utilizado nos estudos posteriores. O zeólito NaX possui uma razão Si/Al de 1,64 e o NaY de 2,83.

No restante procedimento experimental, utilizou-se o zeólito Y em pó, na sua forma básica (NaY), obtido comercialmente da *Zeolyst International* para as diferentes permutas iónicas. Antes do procedimento de permuta iónica, a estrutura zeolítica foi colocada na pistola de secagem *Büchi* a 120 °C durante 12 horas a fim de remover a água retida na estrutura cristalina do zeólito.

O polímero utilizado foi o polietileno (PE) na forma de grânulos, fornecido pela empresa *Amcór Flexibes* (Portugal).

3.1.2. REAGENTES

Para a permuta iónica do Zeólito Y foi utilizado o nitrato de prata (I), nitrato de zinco (II) e nitrato de cobre (II). Estes reagentes foram utilizados sem qualquer método adicional de purificação e as suas características encontram-se descritas na tabela 3.1.

Tabela 3.1. Características dos reagentes utilizados na permuta iónica.

Reagente	Fórmula Molecular	Massa molecular (g/mol)	Frases de Risco (R)	Frases de Segurança (S)	Marca
Nitrato de prata (I)	AgNO ₃	169,87	8-34-50/53	26-45-60-61	<i>Fisher Scientific</i>
Nitrato de zinco (II)	Zn(NO ₃).4H ₂ O	261,46	22-36/37/38	17-26	<i>Merck</i>
Nitrato de cobre (II)	Cu(NO ₃).3H ₂ O	232,59	8-22-34	17-26-45	<i>Riedel de Haen</i>

3.2. SELEÇÃO DA ESTRUTURA FAUJASITE

O tema desta tese surge em seguimento do estudo iniciado no projeto de licenciatura em Bioquímica intitulado "*Encapsulamento de agentes antimicrobianos em nanoestruturas*" [124]. Nesse estudo, os zeólitos NaX e NaY foram permutados com uma solução de nitrato de prata 0,05M (procedimento similar ao apresentado em 3.3.1.1), caracterizados através de técnicas analíticas como microscopia eletrónica de varrimento (SEM), espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR), difração de raios-X (XRD) e sujeitos a ensaios de suscetibilidade microbiana utilizando a bactéria *E. coli* como microrganismo indicador de sensibilidade.

A utilização destes materiais numa fase inicial do presente trabalho prende-se com a necessidade de fundamentar a escolha da estrutura faujasite através dos seus análogos, X e Y, para a obtenção dos objetivos pretendidos. Para tal, efetuou-se a análise destes materiais recorrendo a técnicas como espectroscopia fotoeletrónica de raios-X (XPS) e análise química, e submeteram-se a testes para avaliação das suas propriedades antimicrobianas, utilizando um painel mais alargado de microrganismos indicadores de sensibilidade: as bactérias *E. coli* e *Bacillus subtilis* (*B. subtilis*), e as leveduras *Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*) e *Candida albicans* (*C. albicans*). A descrição destes ensaios antimicrobianos será apresentada no item 3.5.3 (Avaliação da atividade antimicrobiana dos zeólitos em pó).

3.3. PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS

3.3.1. PERMUTA IÓNICA - ZEÓLITOS

Com o objetivo de preparar materiais com propriedades antimicrobianas, o zeólito do tipo NaY foi selecionado como suporte inorgânico recetor dos iões prata, cobre e zinco, referidos na literatura como iões com atividade antimicrobiana. Para além da permuta do zeólito com cada um dos iões mencionados (zeólito monometálico), também se efetuou a permuta do zeólito NaY com dois iões metálicos (zeólito bimetálico). Desta forma, o procedimento de permuta iónica deu-se em duas fases:

3.3.1.1. PREPARAÇÃO DE ZEÓLITOS MONOMETÁLICOS

Considerando como exemplo o procedimento de permuta iónica de NaY com soluções de nitrato de prata: às soluções de 50 mL de nitrato de prata 0,010 M e 0,025 M adicionou-se 6,0 g de zeólito NaY, em balões de fundo redondo protegidos da luz a fim de evitar a redução de prata. Estes balões foram colocados a agitar à temperatura ambiente e a uma velocidade de rotação de 500 rpm, durante 24 horas. Após esse período de tempo, as suspensões obtidas foram filtradas sob vácuo num

funil com placa porosa G4, lavadas com água destilada para remover os iões NO_3^- e colocadas na estufa a 90°C durante aproximadamente 12 horas. As amostras removidas do funil foram então calcinadas no forno tubular *Termolab* a 500°C de acordo com a figura 3.1. As calcinações foram realizadas para garantir que os iões metálicos se encontram no interior das estruturas zeolíticas.

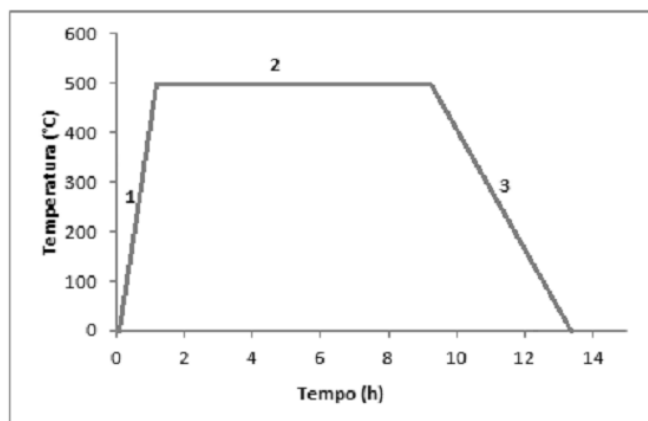


Figura 3.1. Representação do gradiente de temperatura utilizado no procedimento de calcinação das amostras preparadas. Curva 1 corresponde à fase de aquecimento dos 20°C até aos 500°C , à velocidade de $5^\circ\text{C}/\text{min}$ (1h30min). Na curva 2 a temperatura é mantida a 500°C durante 8 horas. Por último, a curva 3 representa o arrefecimento até à temperatura ambiente. Foi utilizado um fluxo de ar de 30-40 mL/min durante as calcinações. [Modificado de 49].

No final deste procedimento, o nome do zeólito monometálico derivou de:

✓ *lão permutado + designação do zeólito (Y) + concentração da solução do ião permutado.*

Exemplo: AgY 0,025 M.

Este procedimento foi igualmente realizado com os iões cobre e zinco; contudo, nestes casos, apenas se preparou uma solução de nitrato de cobre 0,010 M e uma solução de nitrato de zinco 0,050 M. Assim, no final desta fase obtiveram-se os materiais apresentados na tabela 3.2.

Tabela 3.2. Zeólitos monometálicos

Zeólito partida	[Soluções] utilizadas	Designação do Material
NaY	AgNO_3 0,010 M	AgY 0,010 M
	AgNO_3 0,025 M	AgY 0,025 M
	$\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$ 0,010 M	CuY 0,010 M
	$\text{Zn}(\text{NO}_3)_2$ 0,050M	ZnY 0,050 M

3.3.1.2. PREPARAÇÃO DE ZEÓLITOS BIMETÁLICOS

Para a realização das permutas iônicas em questão, considerando-se como exemplo a preparação do zeólito bimetálico de zinco e prata, e utilizando como material de partida o ZnY 0,050 M, prepararam-se soluções de nitrato de prata 0,010 M; 0,025 M e 0,050 M. A cada uma destas soluções adicionou-se 1,5 g de ZnY 0,050 M e realizou-se o procedimento descrito em 3.3.1.1. Após a calcinação, o nome do zeólito bimetálico derivou de:

✓ *Primeiro íon permutado + segundo íon permutado + designação do zeólito (Y) + respetiva concentração da solução do segundo íon.*

Exemplo: ZnAgY 0,010 M

Assim, no final desta fase obtiveram-se os seguintes zeólitos bimetálicos (Tabela 3.3).

Tabela 3.3. Zeólitos bimetálicos preparados

Zeólito partida	[soluções] utilizadas	Designação do Material
ZnY 0,050 M	AgNO ₃ 0,010 M	ZnAgY 0,010 M
	AgNO ₃ 0,025 M	ZnAgY 0,025 M
	AgNO ₃ 0,050 M	ZnAgY 0,050 M
AgY 0,010 M	Zn(NO ₃) ₂ 0,050 M	AgZnY 0,050 M
	Cu(NO ₃) ₂ 0,010 M	AgCuY 0,010 M
CuY 0,010 M	AgNO ₃ 0,010 M	CuAgY 0,010 M
	Zn(NO ₃) ₂ 0,050 M	CuZnY 0,050 M

3.3.2. PREPARAÇÃO DOS COMPÓSITOS EM FILMES DE POLIETILENO

O procedimento de incorporação das amostras zeolíticas em polietileno foi realizado sempre da mesma forma, havendo apenas variação do zeólito introduzido e na sua percentagem (1, 3 e 5%).

Numa primeira fase, preparou-se o polietileno em pó a partir das resinas e composição fornecidas pela empresa *Amtcor*: 80 % da resina F e 20 % da resina D, utilizando um moinho *Retsch*. Após a mistura da quantidade necessária de polietileno e zeólito para obter um composto de 0,5 g, procedeu-se à sua homogeneização num almofariz de ágata. Posteriormente, os materiais foram sujeitos a uma temperatura de 190 °C na prensa *SPECAC* de forma a permitir a fusão do material e a obtenção de um filme homogéneo.

Os filmes compósitos obtidos numa percentagem de 5 % (p/p) foram NaY; AgY 0,025 M e ZnY 0,05 M. Por sua vez os materiais AgY 0,05 M; ZnAgY 0,025 M e ZnAgY 0,05 M foram incorporados em polietileno nas percentagens de 1, 3 e 5 % (p/p). Este procedimento foi igualmente realizado com o polipropileno a fim de averiguar as diferenças de aspeto dos compósitos obtidos, apenas com 5% de NaY; AgY 0,025 M e ZnAgY 0,025 M.

3.4. TÉCNICAS DE CARACTERIZAÇÃO

3.4.1. ESPETROSCOPIA DE INFRAVERMELHO COM TRANSFORMADA DE FOURIER (FTIR)

✓ DESCRIÇÃO GERAL DA TÉCNICA DE FTIR

A espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier é uma técnica analítica muito útil em análise estrutural de compostos, pois permite identificar grupos funcionais e elucidar a estrutura molecular de compostos orgânicos e inorgânicos puros, assim como de impurezas associadas a estes [125,126].

Esta espectroscopia de absorção, baseada na vibração dos átomos e das moléculas, utiliza a região do infravermelho (IV) do espectro eletromagnético que se situa entre $4000\text{--}200\text{ cm}^{-1}$ [126-128]. Quando uma amostra é sujeita a radiação IV, existe uma certa fração da radiação incidente que é absorvida a uma determinada energia, gerando-se assim um espectro IV. A energia a que qualquer banda de absorção aparece no espectro de IV corresponde à frequência de vibração de uma dada ligação química na amostra [125-127].

Para que os modos vibracionais da molécula apareçam no espectro de IV é essencial que a radiação IV induza uma variação no momento dipolar das suas ligações químicas ou grupos funcionais [126,128]. Numa molécula, os modos vibracionais envolvem variação do comprimento de ligação química – estiramento – ou variação do ângulo de ligação – deformação [49,127,128]. Estes modos vibracionais encontram-se representados na figura 3.2.

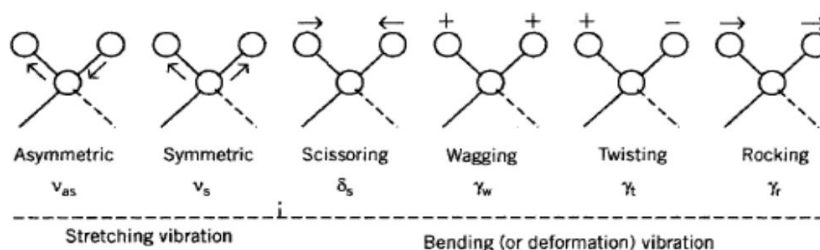


Figura 3.2. Seis tipos diferentes de modos vibracionais de uma molécula. As duas primeiras são exemplos de estiramento simétrico e assimétrico, e os outros quatro de deformação (os símbolos “+” e “-” referem-se a vibrações que são perpendiculares ao plano da página ^[126]).

✓ CARACTERIZAÇÃO DOS ZEÓLITOS POR FTIR

A técnica de FTIR é bastante útil na caracterização de estruturas zeolíticas. O zeólito utilizado neste trabalho, pertencente à família FAU, apresenta no seu espectro de infravermelho essencialmente três zonas características [49,59]:

- (i) Vibrações de deformação do anel duplo entre 550 e 650 cm^{-1} ;
- (ii) Vibrações de estiramento simétrico e assimétrico das ligações T-O-T (tetraedros SiO_4 e AlO_4) entre 650 e 1200 cm^{-1} ;
- (iii) Vibrações dos grupos hidroxilos (T-OH) localizados à superfície ou no interior das cavidades a frequências superiores a 3000 cm^{-1} .

A presença de água na estrutura zeolítica também origina uma banda de absorção na região 1600-1650 cm^{-1} [49]. A figura 3.3. apresenta o espectro de FTIR do zeólito NaY, com as zonas anteriormente referidas assinaladas [59].

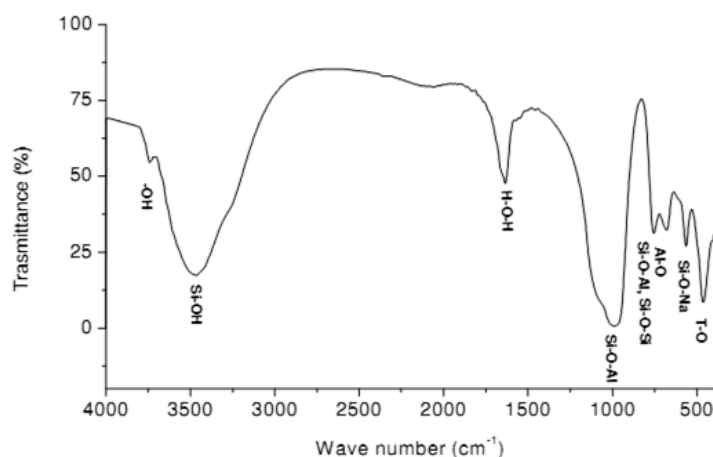


Figura 3.3. Espectro de infravermelho do zeólito Y [59].

A técnica de FTIR pode ainda possibilitar a deteção de metais imobilizados na estrutura zeolítica através da observação das regiões não absorventes no espectro do zeólito, que se situam na região dos 1200-1600 cm^{-1} [49].

A região de infravermelho entre 570-600 cm^{-1} pode ser utilizada para calcular a razão Si/Al da rede [129,130] usando a equação

$$x = 3.857 - 0,00621 w_{DR} (\text{cm}^{-1}), \quad (3.1)$$

onde $x = [1 + (\frac{Si}{Al})]^{-1}$, com $0,1 < x < 0,3$ e w_{DR} é o valor específico da vibração do anel entre 570-600 cm^{-1} [129,130].

✓ CARACTERIZAÇÃO DE POLIETILENO POR FTIR

O polietileno é dos polímeros mais estudados mundialmente e já se encontra bastante bem caracterizado por FTIR, sendo que qualquer alteração na sua estrutura cristalina pode ser detetada recorrendo a esta técnica. Na tabela 3.4 são enumeradas as bandas de absorção presentes no espectro de infravermelho do polietileno.

Tabela 3.4. Bandas características de Polietileno [131,132]

Banda (cm^{-1})	Atribuição
2919	Vibração assimétrica C-H em CH_2
2851	Vibração simétrica C-H em CH_2
1473 e 1463	Vibrações de deformação de C-H em CH_2
1377	Deformação simétrica CH_3
731-720	Vibrações angulares de CH_3

✓ CONDIÇÕES INSTRUMENTAIS

As amostras zeolíticas e os filmes compósitos de polietileno preparados foram caracterizados por FTIR. As análises foram realizadas num espectrofotómetro de IV com transformadas de Fourier (*ABB FTLA2000*) na região de $4000\text{-}500\text{ cm}^{-1}$ em modo de transmissão e com uma resolução de 4 cm^{-1} . No caso dos zeólitos foram efetuados 4 varrimentos, enquanto nos filmes compósitos foram utilizados 16 varrimentos.

Para a realização destes ensaios os compósitos de polietileno não precisaram de sofrer qualquer tratamento, contudo no caso dos zeólitos era necessário preparar pastilhas de brometo de potássio (KBr). Na preparação das pastilhas utilizou-se uma proporção de 0,002 g de amostra para 0,098 g de KBr, tendo-se homogeneizado a mistura num almofariz de ágata. Em seguida, o pó homogêneo foi prensado utilizando uma prensa (*Manfredi*) com um peso de 5 toneladas.

3.4.2. MICROSCOPIA ELETRÓNICA DE VARRIMENTO (SEM)

✓ DESCRIÇÃO GERAL DE SEM

A microscopia eletrónica de varrimento é uma técnica analítica muito utilizada na caracterização da topografia superficial de materiais desenvolvidos em todos os domínios da ciência, tecnologia e indústria. O conhecimento detalhado da microestrutura destes materiais permite o entendimento e, em muitos casos até, a previsão das suas propriedades e comportamento [49].

A técnica de SEM consiste em incidir um feixe de elétrons, com uma energia entre 0,5 e 30 KeV, diretamente na amostra. Como resultado da interação do feixe de elétrons com a superfície da amostra, uma série de radiações são emitidas, tais como elétrons secundários, elétrons retrodifundidos, raios-X característico, elétrons Auger, fótons, etc (Figura 3.4.). Quando estas radiações são captadas corretamente, fornecem informações características sobre a topografia da superfície, composição, entre outras características da amostra [49,133-135].

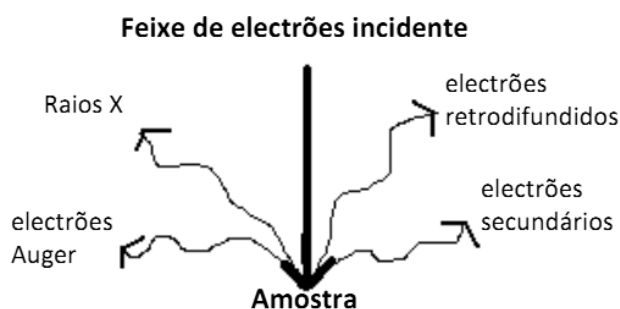


Figura 3.4. Representação esquemática de algumas das radiações emitidas após colisão de um feixe de elétrons na superfície de um material condutor [135].

Na microscopia eletrônica os sinais de maior interesse para a formação da imagem são os elétrons secundários e os retrodifundidos. À medida que o feixe de elétrons primários vai varrendo a amostra estes sinais vão sofrendo modificações de acordo com as variações da superfície. Os elétrons secundários, gerados por colisão inelástica, fornecem imagens da topografia da amostra com uma grande precisão e profundidade. Por sua vez, as imagens com maior contraste são obtidas pela detecção de elétrons retrodifundidos de elevada energia. Estes elétrons, gerados por colisões elásticas, são provenientes das camadas mais profundas da amostra, logo fornecem informações acerca da composição química da amostra [133].

O SEM tem o seu potencial mais desenvolvido com a adaptação de detetores de energia dispersiva de raios-X (EDX) na câmara de amostra. Através da detecção dos raios-X característicos emitidos pela amostra, resultado da interação dos elétrons primários com a superfície, é possível determinar quantitativamente e qualitativamente a composição química de regiões até 1 μm de comprimento do local de incidência do feixe de elétrons. A conjugação das técnicas SEM/EDX permite obter imagens tridimensionais da amostra, e mapas de composição dos elementos à superfície [127,128,136].

✓ CONDIÇÕES INSTRUMENTAIS

A análise superficial de SEM dos zeólitos permutados com os diferentes íons metálicos foi obtida recorrendo ao uso do microscópio eletrónico de varrimento *LEICA CAMBRIDGE S360*, equipado com um sistema de EDX. As amostras zeolíticas foram previamente colocadas numa fita de carbono e recobertas com uma fina camada de ouro durante 15 minutos. A ampliação utilizada foi de 5000x e o feixe de energia foi de 14 kV. A análise de EDX foi realizada antes das amostras serem revestidas com o filme de ouro.

No caso do estudo da distribuição das partículas zeolíticas na matriz polimérica foi feito o estudo dos eletrões retrodifundidos a uma tensão de aceleração de 15 kV e uma ampliação de 500x.

3.4.3. DIFRAÇÃO DE RAIOS-X (XRD)

✓ DESCRIÇÃO GERAL DE XRD

XRD é frequentemente utilizada para obter informações acerca da estrutura, composição e orientação dos estados policristalinos dos materiais [49]. Esta técnica estuda a forma como as estruturas cristalinas difratam a radiação incidente de raios-X, cujo comprimento de onda é da mesma ordem de grandeza das distâncias interatômicas numa rede cristalina [49,137].

Nos sólidos cristalinos é possível estabelecer planos cristalinos com orientações bem definidas, segundo o arranjo estrutural do mesmo [49]. Quando se incide radiação de raios-X num material cristalino pulverizado, radiação eletromagnética de comprimento de onda da ordem do 1 Å, os diferentes planos cristalinos presentes no mesmo refletem parte da radiação, sendo o ângulo de reflexão igual ao ângulo de incidência. Para que as ondas refletidas pelos diferentes planos cristalinos estejam em fase, isto é, para que ocorra interferência construtiva com reflexão máxima da radiação, é necessário existir uma relação entre o comprimento de onda da radiação, a distância interatômica entre os planos cristalinos e o ângulo de incidência, sendo esta relação dada pela lei de *Bragg*:

$$n\lambda = 2d\sin\theta \quad (3.2)$$

onde *d* representa a distância interatômica entre os planos cristalinos, λ o comprimento de onda, θ o ângulo de *Bragg* e *n* a ordem de difração (número inteiro). A parte difratada pela estrutura cristalina só existe em direções bem definidas, correspondentes a ângulos 2θ do feixe incidente. A equação de *Bragg* é útil apenas quando o espaçamento entre as camadas e o comprimento da radiação é da mesma ordem de grandeza [59,126,136,137].

✓ CARACTERIZAÇÃO DE ZEÓLITOS POR XRD

O XRD é uma técnica bastante importante na caracterização estrutural de zeólitos, na medida em que permite determinar o tamanho e a forma das suas células unitárias e os parâmetros de malha da rede cristalina. Num zeólito a distância dos planos interplanares é dada por d_{hkl} , em que hkl são os índices de Miller [49,50]. Assim para zeólitos, a equação 3.2 pode ser representada da seguinte forma:

$$n\lambda = 2d_{hkl}\sin\theta \quad (3.3)$$

Para o caso simples de uma malha cúbica, como é o caso dos zeólitos pertencentes à família FAU, é possível determinar o tamanho da célula unitária (a_0) através da equação 3.4:

$$a_0 = \frac{\lambda \sqrt{h^2+k^2+l^2}}{2\sin\theta} \quad (3.4)$$

Este parâmetro a_0 é calculado através da equação 3.4 tendo em consideração a posição dos picos correspondentes aos índices de Miller [533], [642] e [555], utilizando-se o quartzo como padrão interno de acordo com o método ASTM D 3942-80 (Figura 3.5.).

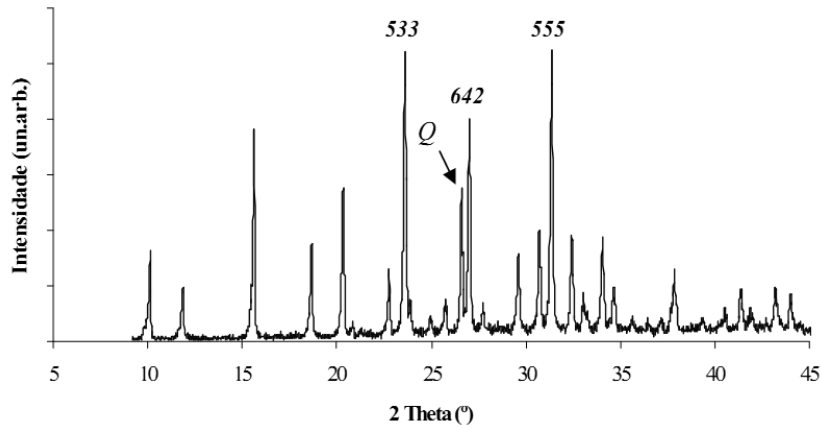


Figura 3.5. Difractograma do zeólito NaY apresentando os índices de Miller 533, 642 e 555 e o pico do padrão interno quartzo assinalado por “Q” [49].

Esta técnica permite determinar a razão Si/Al da rede cristalina do zeólito, o que se revela útil para comparação com a razão Si/Al total obtida por análise química. Este parâmetro é obtido através da determinação do número de átomos de Al da célula unitária, recorrendo ao parâmetro a_0 . A determinação do número de átomos de Al (N_{Al}) é feita através da equação de Flanigen e Breck:

$$N_{Al} = 115,2(a_0 - 24,191), \quad (3.5)$$

onde a_0 é expresso em Å e o valor de 24,191 corresponde ao parâmetro de malha de um zeólito pertencente à estrutura FAU completamente silício ($N_{Al}=0$). A partir do valor de N_{Al} e do número de átomos T por célula unitária (192 no caso de um zeólito FAU) pode-se facilmente determinar a razão Si/Al recorrendo à seguinte equação:

$$\left(\frac{Si}{Al}\right)_{rede} = \frac{192 - N_{Al}}{N_{Al}} \quad (3.6)$$

A difração de raios-X permite ainda determinar a cristalinidade de uma amostra através da equação 3.7[49,50]

$$cristalinidade (\%) = \frac{(\sum Int.picos)_{amostra}}{(\sum Int.picos)_{padrão}} \times 100 \quad (3.7).$$

Esta técnica revela-se bastante útil no estudo de zeólitos permutados com iões metálicos, pois permite verificar se o ião metálico alterou a estrutura cristalina dos zeólitos.

✓ CONDIÇÕES INSTRUMENTAIS

Os difratogramas de raios-X foram obtidos num difractómetro *Phillips Analytical X-Ray* modelo *PW 1710 BASED*, à temperatura ambiente. A velocidade de varrimento foi de $2^\circ \text{C min}^{-1}$, usando uma corrente de cátodo de 30 mA e uma voltagem de 40 kV. As amostras foram preparadas misturando 5 mg de um padrão interno de quartzo com 100 mg de sólido, sendo de seguida homogeneizadas num almofariz de ágata.

3.4.4. ESPETROSCOPIA FOTOELETRÓNICA DE RAIOS-X (XPS)

✓ DESCRIÇÃO GERAL DE XPS

A espectroscopia fotoeletrónica de raios-X é utilizada na caracterização espectroscópica das camadas superficiais (cerca de 50 Å) de materiais sólidos, pois apesar de os raios-X poderem atingir o interior da amostra, apenas os eletrões da superfície podem escapar e ser detetados [125].

O XPS consiste na deteção da energia cinética dos eletrões emitidos do cerne de átomos existentes na superfície do material, após irradiação com fotões de raios-X (Figura 3.6.). A utilização de um feixe de fotões de raio-X com uma frequência elevada leva a que os fotoeletrões emitidos adquiram elevada energia cinética [125,138,139].

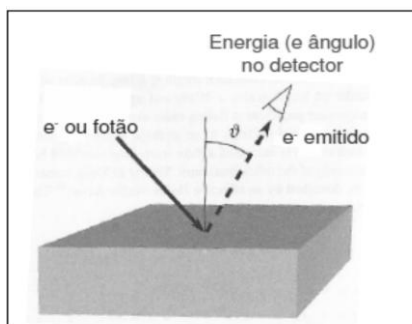


Figura 3.6. Representação esquemática da espectroscopia eletrônica [adaptado de 140].

A distribuição da energia cinética dos fotoelétrons emitidos pode ser medida usando um analisador de energia de elétrons apropriado, obtendo-se assim um espectro [140]. Normalmente a amostra fica carregada positivamente com a emissão do fotoelétrão, causando um desvio na energia de ligação do elétron que depende do estado de oxidação e dos átomos ligados ao elemento irradiado. Estes desvios na energia podem ser corrigidos através de valores que existem tabelados para cada elemento em compostos padrão [140].

Uma vez que as energias de ligação dos elétrons da camada K são características de cada átomo, a análise por XPS permite identificar o elemento presente. A intensidade de energia está também relacionada com o número de elétrons, o que permite obter uma análise química da superfície da amostra analisada. Além disso, a energia de ligação de um determinado elemento dá informação sobre o estado de oxidação e vizinhança química. Os pequenos desvios químicos nos picos de XPS podem ajudar a distinguir as contribuições dos diferentes estados químicos de um elemento em particular [138-140].

A utilização de XPS neste trabalho foi essencial na determinação dos estados de oxidação dos elementos metálicos incorporados no zeólito Y.

✓ CONDIÇÕES INSTRUMENTAIS

A análise de XPS das amostras NaX, NaY, AgX e AgY foi realizada recorrendo ao espectrofotômetro *VG Scientific ESCALAB 250 iXL*, usando uma radiação monocromática Al-K α ($h\nu=1486.6$ eV). Os fotoelétrons foram coletados com um ângulo de incidência relativamente à amostra de 90°. A medição foi feita num Analisador de Energia constante (CAE) com uma energia de passagem de 100 eV para o espectro total e 20 mV de energia para um espectro de alta resolução.

3.4.5. ESPETROSCOPIA DE EMISSÃO ATÓMICA (ANÁLISE QUÍMICA)

✓ DESCRIÇÃO GERAL DE ESPETROSCOPIA DE EMISSÃO ATÓMICA

A espectroscopia de emissão atômica tem bastante potencial na análise qualitativa e quantitativa de espécies atômicas, átomos individuais, ou iões elementares presentes numa amostra. Para este efeito é necessário que as espécies presentes na amostra, após excitação, possam emitir radiação a comprimentos de onda característicos [140]. Nesta técnica espectroscópica, a primeira etapa de todos os procedimentos consiste na atomização da amostra, isto é, na volatilização e decomposição da amostra de forma a produzir uma fase gasosa de átomos e iões.

A principal diferença encontrada entre as diferentes técnicas de espectroscopia de emissão atômica reside no método de atomização empregue [140].

A espectroscopia de emissão atômica com plasma acoplado indutivamente (ICP-AES) utiliza como fonte de atomização um plasma de argon a elevadas temperaturas (7.000 - 10.000 K), parcialmente ionizado e com uma concentração relativamente elevada de eletrões e catiões que o tornam condutor [49]. Após a atomização, a interação da fase gasosa da amostra com radiação eletromagnética na gama do ultravioleta- visível (UV-Vis) leva a que as espécies que se encontravam no estado excitado relaxem para níveis de menor energia - estado fundamental- com consequente emissão de radiação. A radiação emitida é registada num espectro descontínuo de emissão, que consiste num conjunto de linhas representativas de transições eletrónicas bem definidas. O número de linhas do espectro de um elemento é dependente do número de eletrões excitáveis do mesmo, bem como dos estados excitados para o mesmo eletrão [49,137].

O ICP-AES é reconhecido pela sua capacidade de realizar análises multi-elementares, uma vez que pode excitar os vários analitos da amostra simultaneamente, permitindo, assim, estabelecer conclusões que não seriam possíveis com a avaliação de um único elemento [140]. Devido às suas características, o ICP-AES é bastante útil na caracterização de materiais com diferentes iões metálicos, pois permite avaliar se efetivamente os processos de permuta iónica foram eficientes na introdução dos iões metálicos na estrutura zeolítica.

✓ CONDIÇÕES INSTRUMENTAIS

A análise química dos materiais preparados foi efetuada no Laboratório de Análises do Instituto Superior Técnico, recorrendo ao espectrofotómetro de absorção atómica *Philips ICP PU 7000 Spectrometer* e utilizando o método de quantificação SMEWW 3120.

3.5. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

3.5.1. MICRORGANISMOS

Para a avaliação da atividade antimicrobiana das amostras zeolíticas preparadas e dos compósitos poliméricos selecionou-se a bactéria Gram-negativa *E. coli* CECT423 e a bactéria Gram-positiva *B. subtilis* 4886, para além das leveduras *C. albicans* IGC 3436T e *S. cerevisiae* BY4741, como microrganismos indicadores de sensibilidade. Estes microrganismos foram obtidos da coleção de culturas do Departamento de Biologia da Universidade do Minho.

3.5.2. MEIOS DE CULTURA E CONDIÇÕES DE CRESCIMENTO

Ao longo deste trabalho as bactérias (*E. coli* e *B. subtilis*) foram repicadas em condições de assepsia para placas contendo meio *Lysogeny Broth* (LB) suplementado com agar (LBA), cuja constituição se descreve na tabela 3.5. O seu cultivo foi promovido a uma temperatura de 37 °C durante 24 horas para obtenção de culturas frescas.

Tabela 3.5. Constituição do meio *Lysogeny Broth* suplementado com agar

Componente	Concentração [% (p/v)]	Fornecedor
Tryptona	1,0	Quilaban
Extracto de levedura	5,0	Merck
NaCl	0,5	Panreac
Agar	2,0	José M Vaz Pereira

O cultivo das leveduras (*C. albicans* e *S. cerevisiae*) foi promovido a 30 °C durante 42 horas em placas contendo meio Yeast Peptone Dextrose (YPD) suplementado com agar (YPDA), preparado de acordo com a tabela 3.6.

Tabela 3.6. Constituição do meio Yeast Peptone Dextrose Agar

Componente	Concentração [% (p/v)]	Fornecedor
Peptona	1,0	Sigma
Extracto de levedura	1,0	Merck
Glucose	2,0	Sigma
Agar	2,0	José M Vaz Pereira

Para avaliação da atividade antimicrobiana dos zeólitos mono e bimetálicos (tabelas 3.1 e 3.2) ambos os meios usados foram suplementados com o zeólito em estudo nas concentrações de 0,01; 0,1; 0,2; 0,3; 0,5, 1 e 2 mg/mL, recorrendo-se a um banho de ultra-sons WVR para garantir a suspensão dos zeólitos no meio.

Para o ensaio antimicrobiano com os compósitos de polietileno, foram igualmente utilizados meios YPDA e LBA.

Todos os meios utilizados durante o presente trabalho, foram esterilizados em autoclave a 120 °C e 1 atm.

3.5.3. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DOS ZÉOLITOS EM PÓ

A atividade antimicrobiana dos zeólitos mono e bimetálicos foi avaliada através de uma adaptação do método de diluição em agar [141]. Este ensaio tinha por objetivo determinar a concentração mínima inibitória (MIC), isto é, a mais baixa concentração de agente antimicrobiano que inibe o crescimento de determinado microrganismo.

Para tal, a partir das culturas frescas das bactérias anteriormente referidas, inocularam-se *erlenmeyers* com meio LB e promoveu-se o crescimento a 37 °C e 200 rpm até se obter uma densidade óptica de 0,5; avaliada a $\lambda = 600$ nm. Procedeu-se à centrifugação de 2,5 mL de cada cultura na centrífuga *Eppendorf* a 4 °C, 5000 rpm, durante 5 minutos. Após centrifugação removeu-se o sobrenadante e lavou-se o sedimento celular com água. Procedeu-se a nova centrifugação nas condições atrás referidas e ressuspendeu-se o pellet em 2,5 mL de meio LB. De seguida, retiraram-se alíquotas para *ependorfs* de forma a obter diluições de 1; 1:10; 1:100; 1:1000; 1:10000 e 1:100000.

O número de unidades formadoras de colónias (UFC) foi determinado a partir da aplicação, em triplicado, de gotas de 20 μ L de cada diluição da cultura em placas de meio LBA e de LBA suplementado com zeólitos mono ou bimetálicos e também de NaY numa gama de concentrações entre 0,01 a 2 mg/mL. Todo o procedimento descrito foi realizado na câmara de fluxo laminar.

As placas foram incubadas durante 24 horas a 37 °C. Após incubação, procedeu-se à contagem do número de colónias presentes em cada gota das diferentes diluições, calculando-se a média desses valores para cada diluição, e procedendo-se à determinação de UFC/mL. Os resultados para cada zeólito mono e bimetálico foram expressos em termos de eficiência antimicrobiana determinada a partir da equação 3.8

$$Eficiência\ antimicrobiana = 100 - \left(\frac{UFC_{M-Y}}{UFC_Y} \times 100 \right) \quad (3.8),$$

onde UFC_{M-Y} representa o número de UFC para o zeólito Y permutado com os diferentes íons metálicos (M) e UFC_Y representa o número de UFC observados na presença do zeólito Y, usado como controlo. Salvo indicação em contrário, todos os resultados correspondem a pelo menos três réplicas.

Para as leveduras, realizou-se exatamente o mesmo procedimento, usando o meio YPD. A temperatura de incubação foi de 30 °C.

De forma a validar os resultados obtidos, este ensaio foi repetido exatamente nas mesmas condições.

3.5.4. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DOS FILMES COMPÓSITOS DE POLIETILENO

De forma a avaliar a atividade dos filmes compósitos de polietileno com diferentes percentagens de zeólitos mono e bimetálicos efetuou-se o teste de difusão em placa. Neste tipo de ensaios, a atividade antimicrobiana do compósito polimérico é avaliada através do aparecimento de uma zona isenta de crescimento celular à sua volta.

Para este efeito, prepararam-se soluções de agar 0,8 % (p/v) liquefeito à qual se adicionou uma suspensão de cada microrganismo em solução salina de modo a que, no ensaio de atividade, o inóculo microbiano fosse de 10^6 células/mL. Esta mistura foi colocada sobre placas contendo o meio de ensaio (LBA ou YPDA), formando um *overlay* uniforme. Após solidificação da *overlay*, procedeu-se à colocação de discos com 6 mm de diâmetro obtidos a partir de diferentes zonas dos filmes compósitos poliméricos. Como controlo foi utilizado o PE e o filme compósito polimérico de NaY. As placas foram incubadas nas condições ótimas de crescimento de cada microrganismo, procedendo-se depois à observação e registo da presença/ausência de halos de inibição do crescimento e à medição dos diâmetros (em mm) desses halos.

Capítulo 4

ANÁLISE E DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

No presente capítulo são apresentados e discutidos os resultados obtidos no decorrer de toda a atividade experimental. Este capítulo encontra-se dividido em 3 partes principais.

A primeira parte consiste na discussão dos resultados mais relevantes para a seleção da estrutura faujasite a utilizar durante o trabalho experimental, nomeadamente resultados de XPS, análise químicas e ensaios de avaliação de propriedades antimicrobianas.

Na segunda parte serão apresentados os resultados da caracterização morfológica e estrutural, bem como dos ensaios de atividade antimicrobiana para os zeólitos monometálicos e bimetálicos.

Por último, será discutida a influência da incorporação das estruturas zeolíticas no filme de polietileno. Serão também apresentados os resultados de avaliação do potencial antimicrobiano dos filmes compósitos utilizando *E. coli*, *B. subtilis*, *S. cerevisiae* e *C. albicans* como microrganismos indicadores de sensibilidade.

4.1. SELEÇÃO DA ESTRUTURA FAU

Este trabalho tem por objetivo desenvolver embalagens poliméricas com propriedades antimicrobianas. De modo a conferir características antimicrobianas ao filme polimérico optou-se por utilizar suportes inorgânicos, tal como os zeólitos, permutados com iões metálicos. Perante a existência de uma vasta gama de estruturas zeolíticas, a seleção da mais apropriada tornou-se um passo preponderante.

Uma vez que a estrutura FAU não é ainda utilizada em embalagens alimentares com o objetivo de controlo microbiano, optou-se por selecionar um dos análogos pertencentes a esta família. Para tal, realizou-se a caracterização morfológica, estrutural e antimicrobiana dos materiais AgX e AgY. Estes materiais, tal como referido no procedimento, já haviam sido preparados numa fase prévia à tese [124].

4.1.1. ANÁLISES MORFOLÓGICAS E ESTRUTURAIS POR SEM, XRD E FTIR

Como referido no capítulo 3, a caracterização das estruturas zeolíticas antes e após o procedimento de permuta iónica foi obtida através de análises morfológicas e estruturais por SEM, FTIR e XRD. A similaridade dos resultados obtidos mostrou que o procedimento de permuta iónica não promove alterações significativas a nível morfológico e estrutural [124]. Isto é, os zeólitos mantêm a integridade da estrutura FAU, como se pode ver na tabela 4.1.

Tabela 4.1. Resultados das análises de SEM e XRD das amostras NaX, AgX, NaY, AgY obtidos no projeto de licenciatura [124]

	NaX	AgX	NaY	AgY
Tamanho partículas (µm) (SEM)	1,5-3,5	1,8-3,5	0,4-0,9	0,5-1,0
Si/Al (XRD)	1,20	1,14	2,83	2,56

4.1.2. ANÁLISE SUPERFICIAL (XPS)

De forma a compreender qual o estado de oxidação dos metais permutados nos zeólitos, procedeu-se à realização de análises por espectroscopia fotoelectrónica de raios-X (XPS). Todas as amostras revelam à sua superfície os elementos característicos das estruturas zeolíticas nos espectros de baixa resolução, nomeadamente oxigénio, sódio, silício e alumínio.

Os espectros de XPS dos zeólitos de partida e das amostras são dominados pelos picos característicos da estrutura FAU, como mostra a figura 4.1 para o NaX (a) e AgX (b), a título de exemplo.

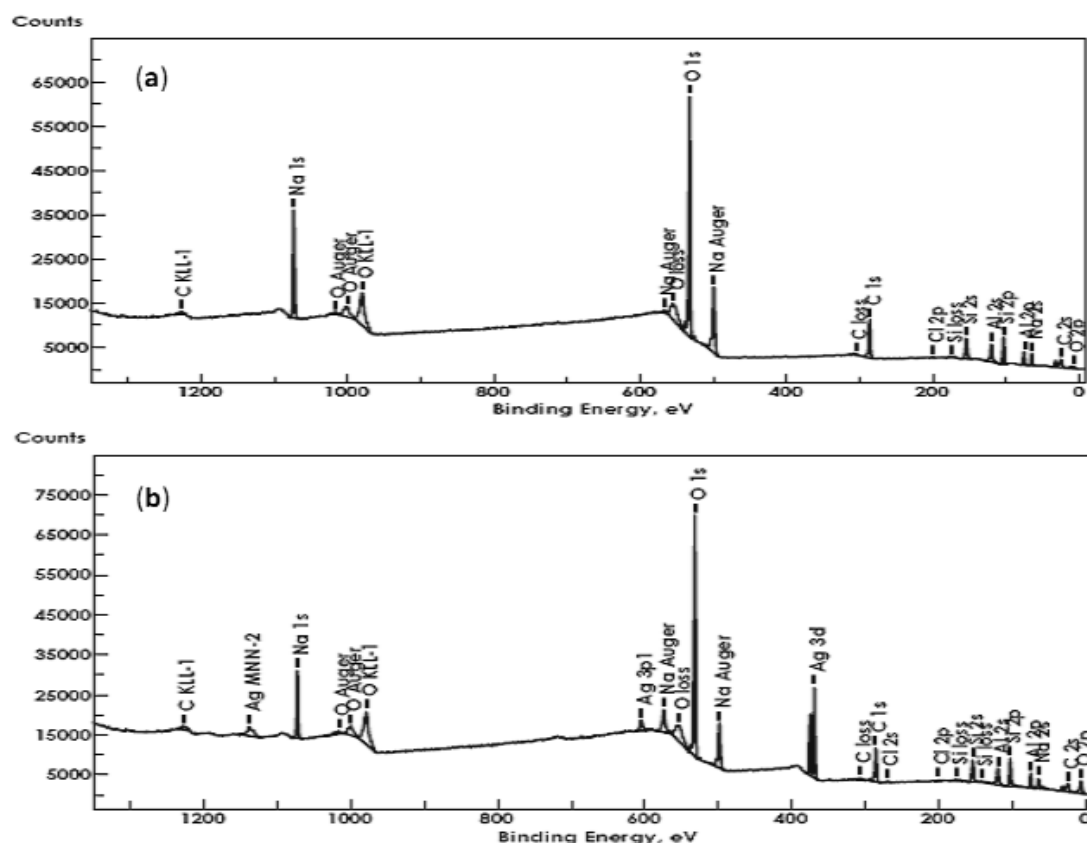


Figura 4.1. Espectros de XPS de NaX (a) e AgX (b).

Ambos os espectros mostram que os picos na região de Si 2p entre 102.2-103.5 eV, na região de Al 2p entre 74.2-75.0 eV e na região de O 1s com um pico largo simétrico a 532.0 eV, correspondem

respetivamente aos tetraedros SiO_4 e grupos Si-OH , ao alumínio dos tetraedros AlO_4 e aos átomos de oxigénio que estão ligados aos tetraedros primários da estrutura. Finalmente, o pico a 1072.0-1075.5 eV na região Na 1s corresponde aos sódios localizados na estrutura zeolítica [142].

A presença de prata na região 3d foi detetada tanto na amostra AgX como AgY. As energias de ligação (BE) dos elementos detetados por XPS são sumarizadas na tabela 4.2.

Tabela 4.2. Energias de ligação dos elementos presentes nas estruturas zeolíticas.

Amostra	Energia de Ligação (eV)						
	Si 2p	Al 2p	Na 1s	C 1s	O 1s	Ag $3d_{5/2}$	Ag $3d_{3/2}$
NaY	103,50	75,00	1072,5	285,0	532,0	--	--
AgY	103,02	74,64	1075,5	285,0	532,0	368,81	374,81
NaX	102,25	74,21	1073,0	285,0	532,0	--	--
AgX	102,28	74,27	1072,0	285,0	531,0	368,69	374,71

A figura 4.2 mostra os espectros de alta resolução para ambos os análogos na região Ag 3d. Em cada análogo é possível observar um pico por volta de 368,0 eV correspondente aos fotoeletrões da orbital Ag $3d_{5/2}$ e um outro a 374,0 eV correspondente à orbital Ag $3d_{3/2}$.

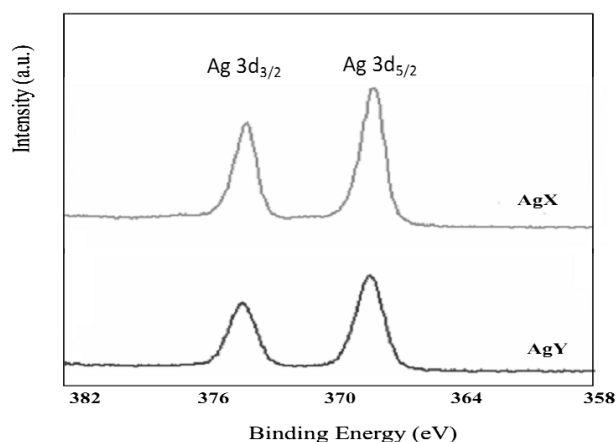


Figura 4.2. Espectros alta resolução de AgX e AgY na região Ag 3d

Destas duas orbitais, apenas a Ag $3d_{5/2}$ poderia ser usada para avaliar o estado de oxidação da prata presente nos análogos, uma vez que a orbital Ag $3d_{3/2}$ é atribuída a ligas de prata [143]. De acordo com a literatura, as espécies iónicas (óxidos) apresentam valores de BE a 367.5 eV [144] e as espécies metálicas a 368.2 eV [145]. Tendo em consideração a proximidade entre os valores de BE determinados para a orbital Ag $3d_{5/2}$, (368,81 para AgY e 368,69 eV para AgX), não é possível fazer a distinção entre as espécies metálicas e iónicas.

De forma a ultrapassar este problema foi determinado o parâmetro Auger (α), visto que a transição Auger Ag M₄VV apresenta um desvio químico mais acentuado. O parâmetro Auger foi calculado a partir de:

$$\alpha = BE(\text{Ag } 3d_{5/2}) + KE(\text{Ag M}_4\text{VV}),$$

onde BE é a energia de ligação dos picos dos foteletrões para Ag 3d_{5/2} e KE é a energia cinética de Auger. De acordo com a literatura, o parâmetro de Auger padrão para a prata metálica é 726.0 eV e para a prata iônica é 724.0 eV [146-148]. Os parâmetros de Auger calculados foram de 724.08 eV para AgY e 725.91 para AgX. Estes resultados sugerem que em NaY a prata se encontra no estado iônico, enquanto que em NaX se encontra no estado metálico. Esta diferença no estado de oxidação da prata pode levar a que os dois análogos apresentem comportamentos diferentes a nível antimicrobiano, uma vez que segundo a literatura a prata metálica só possui atividade antimicrobiana quando existe conversão do estado metálico a estado iônico em meio aquoso [80,84].

Provavelmente, a diferença na razão Si/Al dos zeólitos FAU desempenha um papel importante no estado de oxidação da prata. Esta razão, no caso dos zeólitos FAU, está também relacionada com a força de acidez do zeólito, que tende a aumentar com o aumento da razão Si/Al [69]. A razão Si/Al do zeólito Y é 1.73 maior do que a razão Si/Al do zeólito X. Na tabela 4.3. são apresentadas as percentagens atômicas superficiais das estruturas zeolíticas, obtidas a partir das áreas dos picos mais relevantes dos espectros de alta resolução. De acordo com o número teórico de centros ácidos obtidos através da célula unitária das FAU, o zeólito AgY tem 1,54x10²⁰ e o AgX 0,21x10²⁰ centros ácidos, o que implica que AgY é 7,33 mais ácido que AgX.

Tabela 4.3. Caracterização atômica superficial das estruturas zeolíticas

Amostra	XPS atomic (%)					
	Si	Al	Na	Ag	Si/Al	Ag/Na
NaY	23,8	7,4	11,4	--	3,10	--
AgY	22,7	7,2	4,0	2,3	3,04	0,12
NaX	14,1	9,6	10,6	--	1,42	--
AgX	16,5	9,8	5,3	3,9	1,62	0,16

A partir das percentagens atômicas, é possível verificar que o procedimento de permuta iônica leva a uma diminuição significativa de sódio superficial inerente à estrutura.

4.1.3. ANÁLISE QUÍMICA

A quantidade de prata permutada no interior nas estruturas zeolíticas foi determinada por espectroscopia de emissão atômica com plasma indutivo acoplado (ICP-AES) e os resultados são apresentados na tabela 4.4

Tabela 4.4. Propriedades físico-químicas das estruturas zeolíticas.

	NaY	AgY	NaX	AgX
Si/Al ^a	2,83	--	1,64	--
Na [%] ^a	7,76	5,10	7,00	9,00
Na [mmol] ^b	3,37	2,48	3,91	3,04
Ag [%] ^a	--	9,70	--	9,80
Ag [mmol] ^c	--	0,90	--	0,91
Ag/UC ^d	--	13,5	--	13,9

^a Razão Si/Al total, prata e sódio determinado por ICP-AES.

^b Conteúdo inicial e final de sódio nos zeólitos.

^c Conteúdo de prata nos zeólitos após a troca iônica com AgNO₃

^d Prata por célula unitária, obtida por análise química e XRD.

Como se pode observar, os zeólitos permutados com prata, possuem quantidades deste íon da mesma ordem de grandeza. Era esperado que o zeólito X possuísse mais prata por célula unitária devido à sua baixa razão de Si/Al. É sabido que o decréscimo da razão Si/Al, leva a um aumento da capacidade de permuta iônica e concentração do catião [69]. Comparando os valores de percentagem atômica de prata apresentados na tabela 4.3 e 4.4, verifica-se que a quantidade de prata superficial é diferente da quantidade de prata no interior das estruturas, sugerindo que este metal não se encontra homogeneamente distribuído. Além disso, a percentagem de prata superficial é inferior à existente no interior, indicando que o procedimento de permuta iônica foi eficiente.

Através da tabela 4.3 é ainda possível observar que a quantidade de prata superficial é maior para o zeólito X do que para o Y, contudo nesse zeólito a prata encontra-se no estado metálico (tal como referido na análise de XPS). A razão Si/Al da superfície obtida por XPS mostra que a superfície de ambos os zeólitos FAU é rica em grupos silício. As diferenças entre as razões Si/Al determinadas por XPS (tabela 4.3) daquelas determinadas por análise química (tabela 4.4) indicam uma distribuição irregular de silício e alumínio ao longo da estrutura zeolítica.

4.1.4. ANÁLISE DO POTENCIAL ANTIMICROBIANO

A atividade antimicrobiana dos materiais AgX e AgY já havia sido avaliada, utilizando a *E. coli* como microrganismo indicador de sensibilidade [124]. Nessa altura, constatou-se que para inibir o crescimento deste microrganismo era necessário utilizar uma concentração de 0,2 mg/mL de AgY e de 0,3 mg/mL no caso do zeólito AgX. De entre a gama de concentrações testadas, estas foram as concentrações mínimas inibitórias determinadas (MIC).

A fim de selecionar o análogo FAU mais eficaz, assim como de assegurar que estes materiais possuem um vasto espectro de atividade antimicrobiana contra diversos microrganismos, optou-se por realizar novos ensaios antimicrobianos.

E. coli e *B. subtilis*, bactérias gram-negativa e gram-positiva respetivamente, e as leveduras *S. cerevisiae* e *C. albicans* foram usadas como estirpes indicadoras de sensibilidade a fim de avaliar o potencial antimicrobiano dos zeólitos. Os ensaios foram desenvolvidos utilizando gamas de concentrações entre 0,01 a 1,0 mg/mL, sendo determinada a eficiência antimicrobiana e o valor de MIC para cada zeólito permutado com prata.

Nos ensaios realizados verificou-se que os zeólitos NaX e NaY não demonstraram atividade antimicrobiana nas concentrações testadas, enquanto os zeólitos permutados com prata (AgX e AgY) exibem propriedades antimicrobianas, como demonstrado na figura 4.3 para um exemplo selecionado. Isto evidencia que a atividade antimicrobiana destes materiais encontra-se relacionada com a presença de prata nas estruturas zeolíticas.

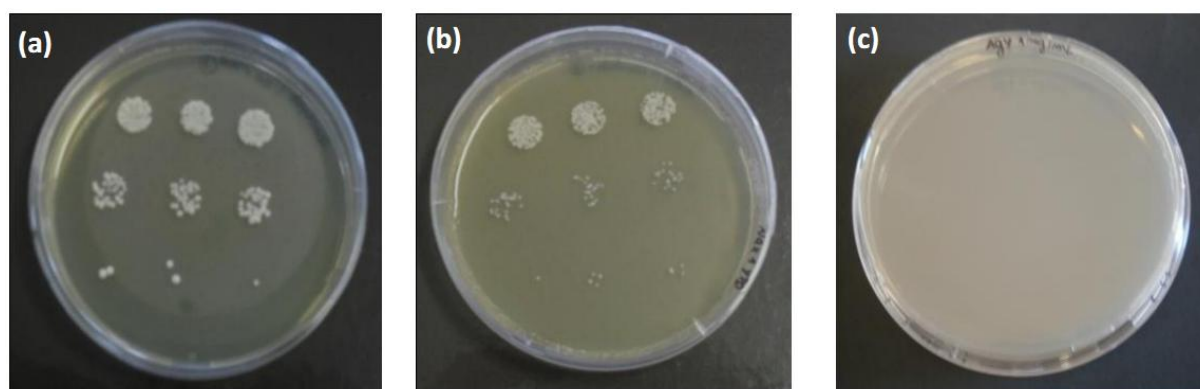


Figura 4.3. Ensaio para avaliação da atividade antimicrobiana contra *S. cerevisiae* na ausência de zeólito (a) e na presença de NaY 1,0 mg/mL (b) e AgY 1,0 mg/mL (c).

Ambos os zeólitos demonstram atividade antimicrobiana, sobretudo contra as bactérias testadas. Contudo, AgY apresenta valores inferiores de MIC quando comparado com o AgX (Tabela 4.5)

Tabela 4.5. Valores de MIC (mg/mL) para AgY e AgX contra cada uma dos microrganismos testados

Microrganismo	MIC (mg/mL)	
	AgX	AgY
<i>E. coli</i>	0,3	0,2
<i>B. subtilis</i>	0,3	0,2
<i>C. albicans</i>	1,0	1,0
<i>S. cerevisiae</i>	1,0	1,0

Na presença de AgY na concentração de 0,2 mg/ mL não foram detetadas quaisquer células viáveis. No caso do AgX o valor de MIC é ligeiramente superior: 0,3 mg/ mL para ambas as bactérias (figuras 4.4 (a) e (b)). Estes resultados podem ser explicados pela presença de prata metálica em AgX (verificado através de XPS), uma vez que esta só atua como agente antimicrobiano quando é convertido a prata iónica [80,84]. Como demonstrado pelos resultados das análises químicas, ambas as estruturas zeolíticas possuem uma percentagem elementar de prata semelhante, o que pode significar que no caso do AgX a conversão da prata metálica a prata iónica foi menor comparativamente à quantidade de prata iónica já existente em AgY. Assim, a presença de prata iónica em AgY conduzirá a valores de MIC inferiores.

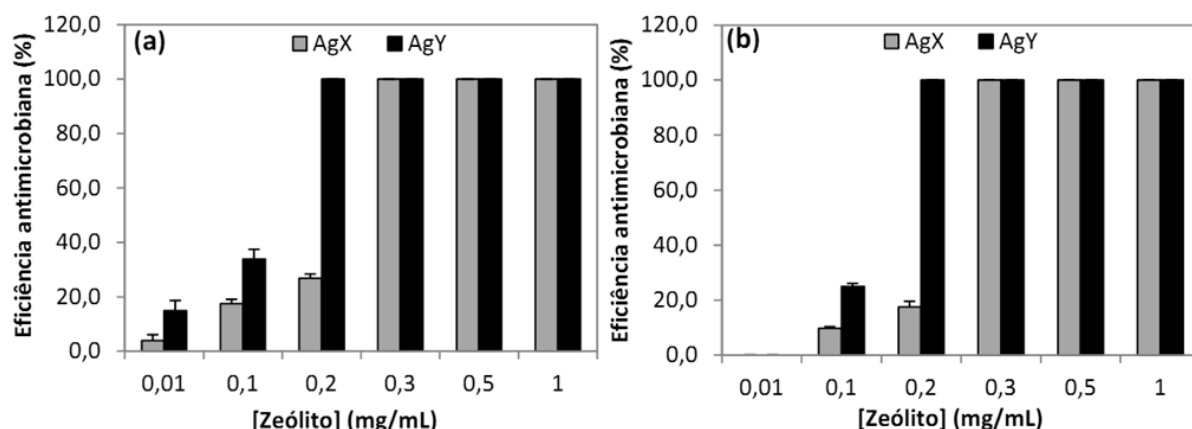


Figura 4.4. Eficiência antimicrobiana (%) de AgX e AgY contra a bactéria gram-negativa *E. coli* (a) e a bactéria gram-positiva *B. subtilis* (b) na gama de concentrações de 0,01 a 1 mg/mL. A eficiência antimicrobiana foi determinada tendo em consideração o número de UFC observadas para o zeólito Y e para o mesmo zeólito permutado com prata. As barras de erro apresentadas correspondem ao desvio padrão de três réplicas.

S. cerevisiae e *C. albicans* demonstraram-se menos sensíveis à ação dos zeólitos permutados com prata do que as bactérias. Para ambas as leveduras o valor de MIC foi de 1 mg/mL (Tabela 4.5; figuras 4.5 (a) e (b)). Segundo Kateřina Malachová *et al.* [93] o valor de MIC determinado para as

leveduras está relacionado com o facto dos iões prata não conseguirem aceder ao sistema de transporte dos iões essenciais destes microrganismos, tal como acontece com os iões zinco e cobre. Desta forma a prata só consegue exercer a sua atividade antimicrobiana quando em concentrações muito elevadas. Por sua vez, nas bactérias a prata consegue facilmente penetrar no interior da membrana plasmática acionando cascatas de sinalização que levam à morte da bactéria [90-93].

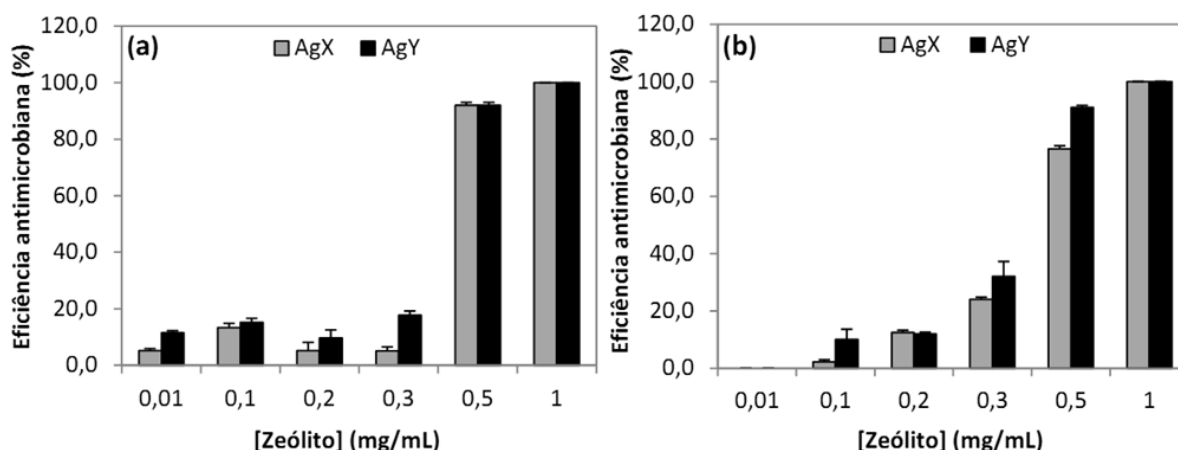


Figura 4.5. Eficiência antimicrobiana (%) de AgX e AgY contra as leveduras *S. cerevisiae* (a) e *C. albicans* (b) na gama de concentrações de 0,01 a 1 mg/mL. A eficiência antimicrobiana foi determinada tendo em consideração o número de UFC observadas para o zeólito Y e para o mesmo zeólito permutado com prata. As barras de erro apresentadas correspondem ao desvio padrão de três réplicas.

Perante os resultados obtidos através das técnicas de caracterização utilizadas e dos ensaios de avaliação das propriedades antimicrobianas, conclui-se que o zeólito NaY ao permitir a permuta de prata iónica na sua estrutura cristalina permite a obtenção de melhores resultados. Assim, no restante trabalho experimental foi utilizado o zeólito NaY.

4.2. ZEÓLITOS MONOMETÁLICOS E BIMETÁLICOS

Após seleção do zeólito NaY como material inorgânico recetor de iões metálicos, procedeu-se à preparação dos novos materiais (referidos em 3.3.1.1 e 3.3.1.2). Numa primeira fase do procedimento de permuta iónica, optou-se por utilizar uma solução de nitrato de prata 0,010 M, uma solução de nitrato de cobre 0,010 M e uma solução de nitrato de zinco 0,050 M. As concentrações destas soluções foram seleccionadas tendo em consideração as taxas limites de migração destes iões para o alimento, permitidas por lei numa embalagem alimentar [121,123]. Com o objetivo de avaliar se as concentrações utilizadas seriam suficientes para conferir propriedades antimicrobianas ao zeólito Y, primeiramente avaliou-se o potencial antimicrobiano destes materiais.

E. coli, *B. subtilis*, *S. cerevisiae* e *C. albicans* foram novamente usadas como estirpes indicadoras de sensibilidade. Neste ensaio apenas se testaram as concentrações de 0,5; 1 e 2 mg/mL de cada zeólito, sendo calculado para cada amostra o valor de MIC. Este ensaio foi realizado em duplicado e em diferentes períodos de tempo (5 meses de diferença) a fim de averiguar, respectivamente, a fiabilidade dos resultados obtidos e a estabilidade. Como se obtiveram os mesmos resultados em termos dos valores de MIC, serão apresentados os gráficos de eficiência antimicrobiana de apenas um dos ensaios contra *E. coli*, *B. subtilis*, *S. cerevisiae* e *C. albicans* nas figuras 4.6, 4.7, 4.8 e 4.9, respectivamente.

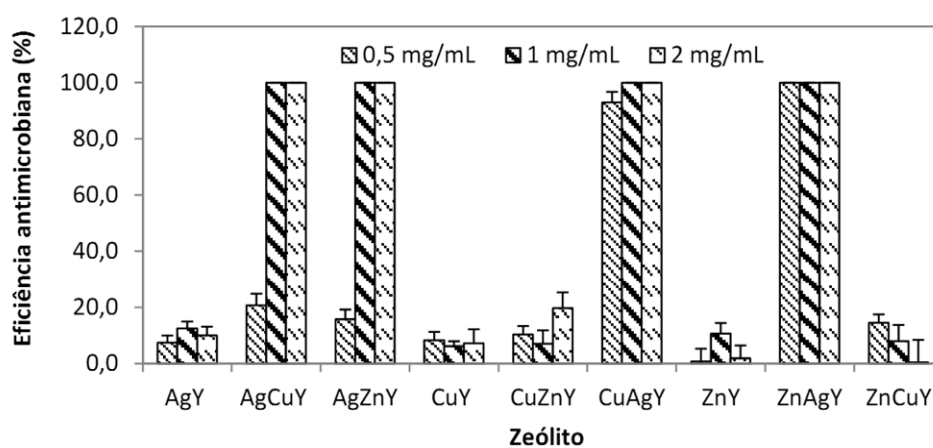


Figura 4.6. Eficiência antimicrobiana (%) dos zeólitos monometálicos (AgY, CuY, ZnY) e bimetálicos (AgCuY, AgZnY, CuZnY, CuAgY, ZnAgY) contra *E. coli* para as concentrações 0,5;1 e 2 mg/mL. A eficiência antimicrobiana foi determinada tendo em consideração o número de UFC observadas para o zeólito Y e para o mesmo zeólito permutado com os diferentes íons metálicos. As barras de erro apresentadas correspondem ao desvio padrão de três réplicas.

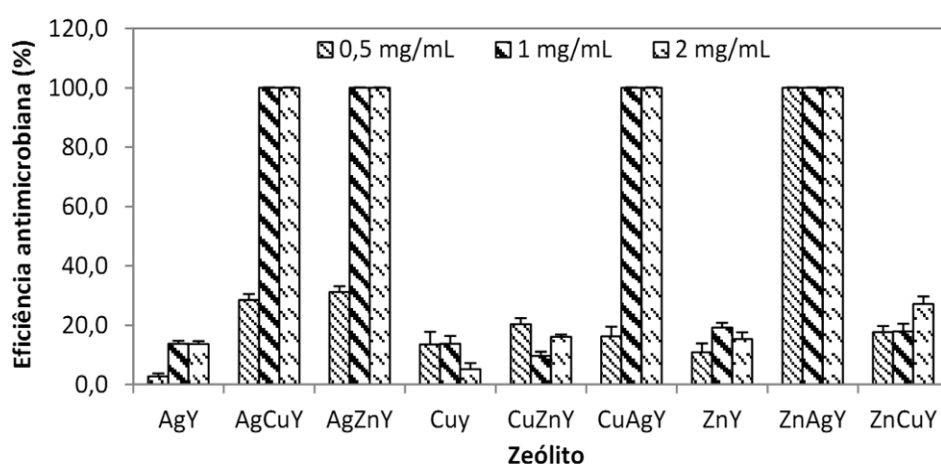


Figura 4.7. Eficiência antimicrobiana (%) dos zeólitos monometálicos (AgY, CuY, ZnY) e bimetálicos (AgCuY, AgZnY, CuZnY, CuAgY, ZnAgY) contra *B. subtilis*. A eficiência antimicrobiana foi determinada tendo em consideração o número de UFC observadas para o zeólito Y e para o mesmo zeólito permutado com os diferentes íons metálicos. As barras de erro apresentadas correspondem ao desvio padrão de três réplicas.

Pela análise das figuras 4.6 e 4.7, verifica-se que os materiais testados possuem um comportamento similar em ambas as bactérias. Relativamente aos zeólitos monometálicos, não foi possível encontrar o MIC para nenhum dos materiais preparados. Isto significa que para inibir o crescimento de *E. coli* e *B. subtilis* seria necessário utilizar concentrações superiores a 2 mg/mL. Por sua vez, para os materiais AgCuY 0,010 M, AgZnY 0,050 M e CuAgY 0,010 M o MIC é de 1 mg/ml e para ZnAgY 0,010M é 0,5 mg/mL. Esta diferença de comportamento entre os materiais preparados, demonstra que nos zeólitos bimetalicos deve existir um efeito de sinergia entre os dois iões permutados, o que permite melhorar a eficiência antimicrobiana do material. É de notar que em todos os materiais bimetalicos com MIC inferior a 2 mg/mL, está presente o ião prata, descrito na literatura como o ião com melhores propriedades antibacterianas [93].

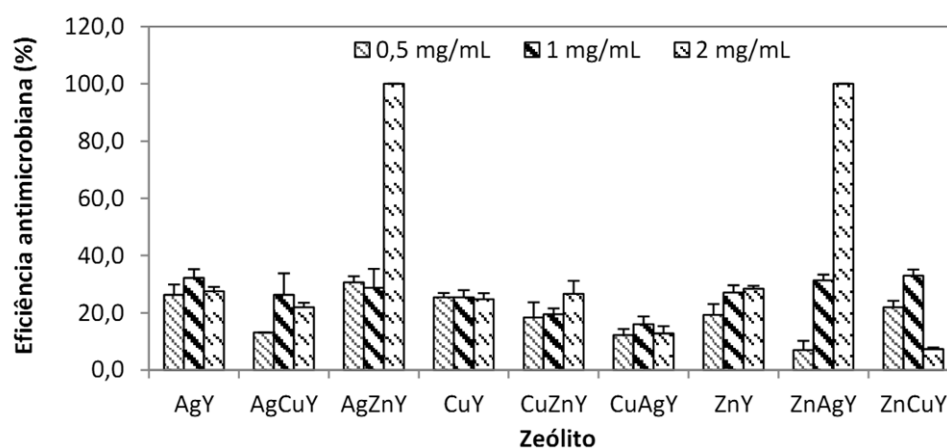


Figura 4.8. Eficiência antimicrobiana (%) dos zeólitos monometálicos (AgY, CuY, ZnY) e bimetalicos (AgCuY, AgZnY, CuZnY, CuAgY, ZnAgY) contra *C. albicans*. A eficiência antimicrobiana foi determinada tendo em consideração o número de UFC observadas para o zeólito Y e para o mesmo zeólito permutado com os diferentes iões metálicos. As barras de erro apresentadas correspondem ao desvio padrão de três réplicas.

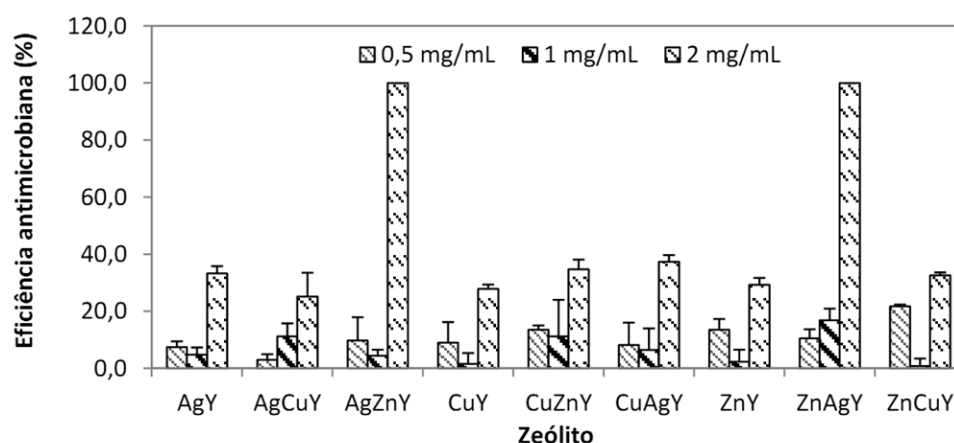


Figura 4.9. Eficiência antimicrobiana (%) dos zeólitos monometálicos (AgY, CuY, ZnY) e bimetalicos (AgCuY, AgZnY, CuZnY, CuAgY, ZnAgY) contra *S. cerevisiae*. A eficiência antimicrobiana foi determinada tendo em consideração o número de UFC observadas para o zeólito Y e para o mesmo zeólito permutado com os diferentes iões metálicos. As barras de erro apresentadas correspondem ao desvio padrão de três réplicas.

Através da observação das figuras 4.8 e 4.9, também se verifica que os materiais testados produzem resultados similares em ambas as leveduras. Assim como nas bactérias, os zeólitos bimetalicos revelaram-se mais eficazes do que os zeólitos monometalicos. Contudo, apenas na presença de AgZnY 0,05 M e ZnAgY 0,01 M numa concentração de 2 mg/mL não é detetada a presença de células viáveis. Seria de esperar, de acordo com os resultados obtidos por Kateřina Malachová *et al* [93], que fossem obtidos melhores resultados antimicrobianos com os iões cobre, pois estes conseguem ser facilmente introduzidos no organismo das leveduras e exercer atividade antimicrobiana quando em elevadas concentrações. Contudo, a baixa concentração da solução de nitrato de cobre (0,01 M) utilizada pode explicar a sua reduzida eficiência antimicrobiana.

A tabela 4.6 sumariza os valores de MIC obtidos para os diferentes zeólitos quando testados contra os diferentes microrganismos.

Tabela 4.6. Valores de MIC (mg/mL) para os zeólitos monometalicos e bimetalicos contra os diferentes microrganismos em estudo.

Amostra	<i>E. coli</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>C. albicans</i>	<i>S. cerevisiae</i>
NaY	>2	>2	>2	>2
AgY 0,01 M	>2	>2	>2	>2
AgCuY 0,01 M	1	1	>2	>2
AgZnY 0,05 M	1	1	2	2
CuY 0,01 M	>2	>2	>2	>2
CuAgY 0,01 M	1	1	>2	>2
CuZnY 0,05 M	>2	>2	>2	>2
ZnY 0,05 M	>2	>2	>2	>2
ZnAgY 0,01 M	0,5	0,5	2	2
ZnCuY 0,01 M	>2	>2	>2	>2

Perante estes resultados, parece claro que as propriedades antimicrobianas destes materiais estão dependentes da concentração das soluções de metais utilizadas na sua preparação, da ordem pela qual os iões são permutados e também dos microrganismos em estudo. Relativamente aos zeólitos monometalicos verifica-se que as concentrações das soluções de prata, cobre e zinco utilizadas na preparação das estruturas zeolíticas deveriam ser mais elevadas, a fim de propiciar melhores efeitos antimicrobianos. Tal, é mais notório no caso da prata se tivermos em consideração os MIC obtidos para os materiais AgX e AgY preparados a partir uma solução de nitrato de prata 0,05 M (parte 4.1).

Dos zeólitos bimetálicos preparados, apenas os pares AgCuY e CuZnY (independentemente da ordem da permuta dos iões) apresentaram o mesmo comportamento. Para o par CuZnY, tal já seria de esperar devido às semelhantes propriedades químicas e antimicrobianas referidas na literatura para estes iões [84,93]. Por sua vez, nas amostras em que a prata foi o segundo ião permutado (CuAgY e ZnAgY) apenas o par ZnAgY apresentou melhores efeitos antimicrobianos contra as bactérias e leveduras. Este facto provavelmente está relacionado com a concentração das soluções dos primeiros iões permutados utilizada, que no caso do zinco é de 0,05 M e do cobre é de 0,01 M. Além disso, também tem de se ter em consideração que os catiões em estudo são permutados em diferentes sítios do zeólito FAU. A célula unitária da estrutura FAU consiste em 192 unidades tetraédricas, 16 prismas hexagonais, 8 cavidades de sodalite (ligadas por anéis duplos de seis membros originando supercavidades) e 8 supercavidades. Na permuta iónica, quando não está em jogo o tamanho do ião metálico, como é o caso, os catiões localizam-se preferencialmente nas cavidades de menores dimensões [52,72]. No caso do ZnAgY, o zinco ocupará em primeiro lugar os sítios disponíveis nas cavidades de menores dimensões como os prismas hexagonais, enquanto a prata, que é permutada após o zinco, vai ocupar os outros sítios para a troca. Provavelmente estes locais estarão mais disponíveis para interagir com os microrganismos.

Tendo em consideração estes resultados, optou-se por preparar AgY a partir de uma solução de nitrato de prata com uma concentração intermédia das já estudadas, nomeadamente 0,025 M. Também se preparou ZnAgY a partir de uma solução de nitrato de prata 0,025 M e 0,050 M mantendo a mesma concentração da solução de zinco. Ou seja, com estes materiais estar-se-ia a estudar a variação da concentração de prata para uma concentração constante de zinco 0,05M. Em seguida será apresentada a caracterização morfológica e estrutural destes materiais, assim como os resultados dos ensaios antimicrobianos obtidos. Por vezes, serão também apresentados resultados referentes à caracterização de alguns dos materiais monometálicos e bimetálicos preparados, como termo de comparação.

4.2.1. ANÁLISE POR SEM E EDX

Com o intuito de obter informações sobre a morfologia do zeólito inicial e modificado por permuta iónica recorreu-se ao SEM. Na figura 4.10 encontram-se representadas as micrografias do zeólito NaY; ZnAgY 0,025 M; ZnAgY 0,050 M e AgY 0,025 M obtidas com uma amplitude de 5000x e escala de 5µm.

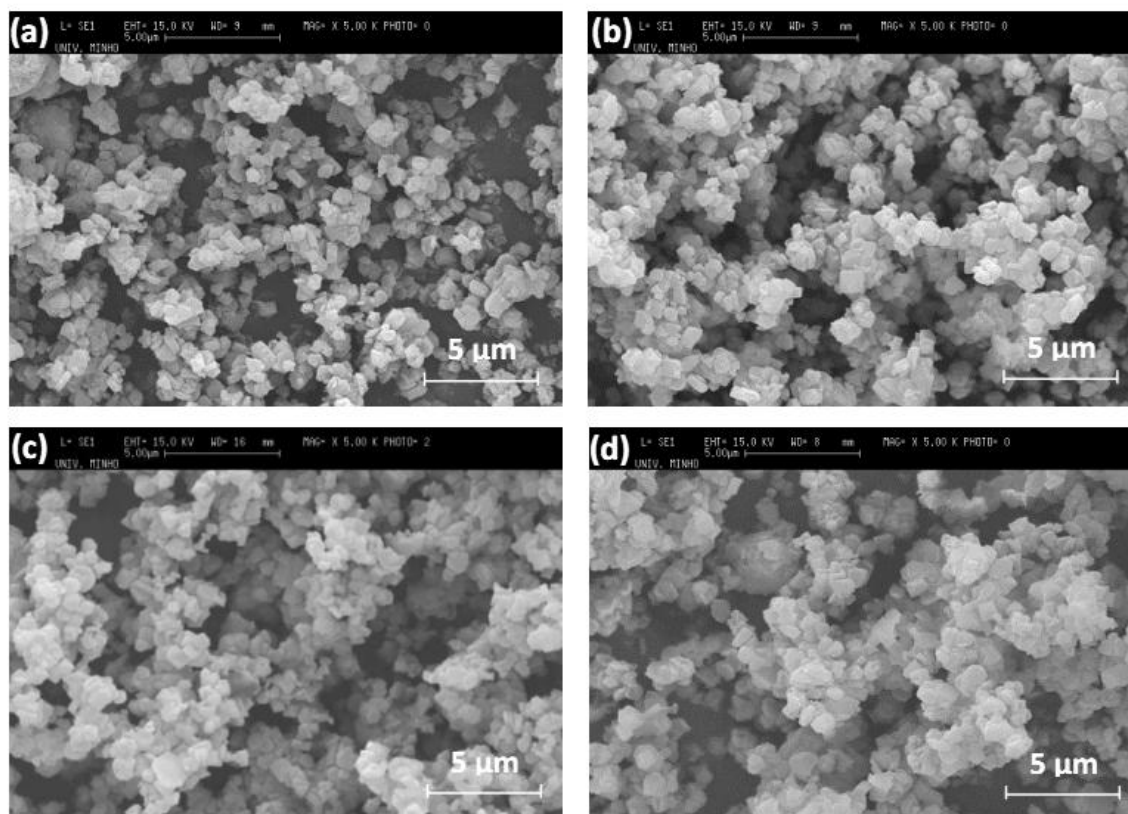


Figura 4.10. Micrografias de SEM de NaY (a); ZnAgY 0,025 M (b); ZnAgY 0,050 M (c) e AgY 0,025 M (d) com a mesma resolução.

A análise das micrografias dos zeólitos mostra que as amostras possuem uma morfologia típica de zeólito aluminosilicato microcristalino, apresentando partículas pequenas de forma geométrica bem definida. As dimensões médias das partículas de NaY variam entre 0,6-1,4 μm ; de ZnAgY 0,025 M entre 0,8-1,2 μm ; de ZnAgY 0,050 M entre 0,6-1,4 μm e de AgY 0,025 M entre 0,8-1,2 μm . Devido à proximidade de tamanho e aparência apresentada pelas partículas, conclui-se que a presença de prata e zinco na estrutura zeolítica, independentemente da concentração das soluções utilizadas, não possui qualquer efeito na morfologia superficial dos zeólitos. Também se verifica que o processo de permuta iônica e de calcinação levam à agregação das partículas zeolíticas, o que era de esperar pois esta estrutura tem tendência a formar aglomerados.

Como o SEM tem acoplado detetores de energia dispersiva de raios-X (EDX), foi possível obter os espectros de EDX das amostras AgY 0,025 M; ZnAgY 0,025 M e ZnAgY 0,05 M. Estes encontram-se representados na figura 4.11. Através de EDX é possível detetar a presença de zinco e prata nas estruturas zeolíticas em estudo. Este tipo de análise também permite a quantificação destes iões, assim como a análise da composição atômica total do zeólito Y (tabela 4.7).

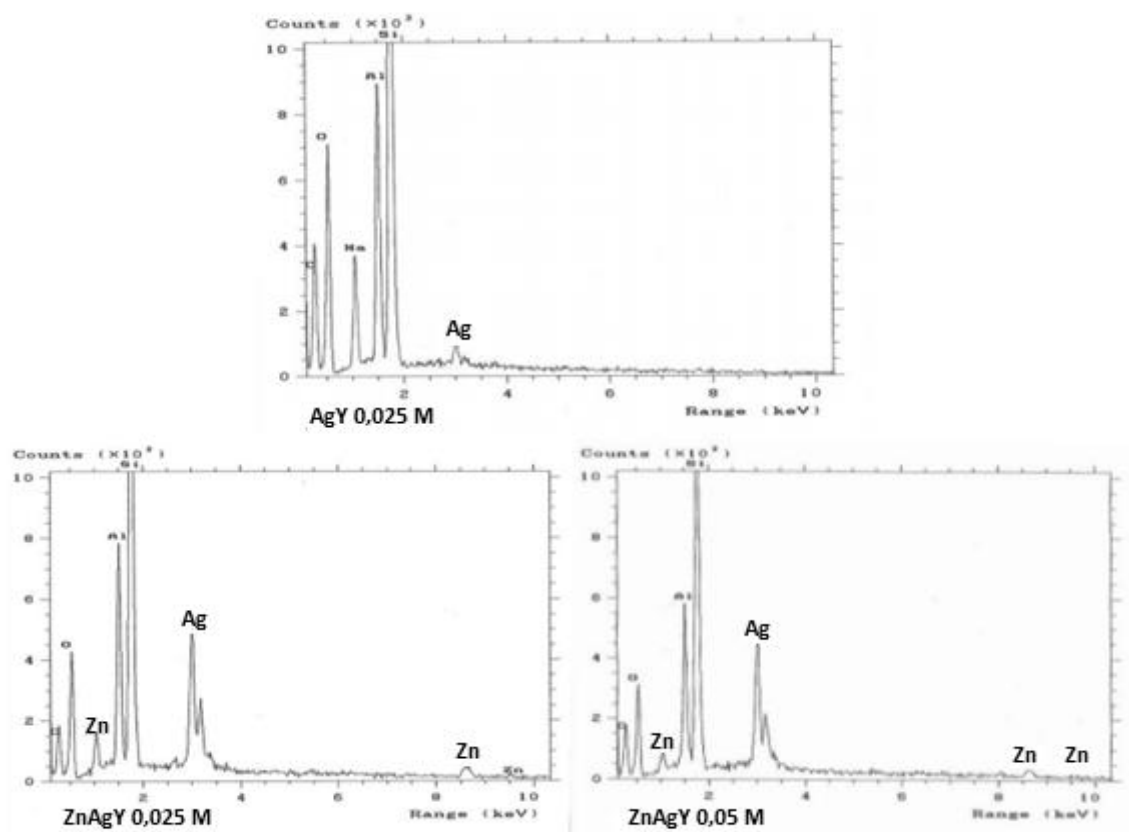


Figura 4.11. Espectros de EDX de AgY 0,025 M; ZnAgY 0,025 M e ZnAgY 0,050 M

Para uma análise mais correta da tabela 4.7 é preciso ter em consideração que os resultados de EDX não são representativos de toda a amostra, uma vez que o feixe de elétrons incide apenas num ponto específico da mesma. Além disso, a análise quantitativa efetuada não contabiliza o oxigénio também presente numa estrutura zeolítica.

Tabela 4.7. Composição atômica (%) das amostras AgY 0,025 M; ZnAgY 0,025 M e ZnAgY 0,050 M obtida por EDX.

Elemento	% atômica		
	AgY 0,025 M	ZnAgY 0,025 M	ZnAgY 0,05 M
Na	24,4	15,6	12,2
Al	21,1	21,9	21,6
Si	53,2	50,5	51,5
Zn	----	3,0	2,8
Ag	1,2	9,0	11,9
Si/Al	2,5	2,3	2,4

Considerando os valores apresentados, verifica-se que a proporção de prata é cerca de 3 vezes maior do que a do zinco em ZnAgY 0,025 M e ZnAgY 0,05 M. Também se pode observar que os valores da razão Si/Al são ligeiramente diferentes entre si, consequência da distribuição não homogênea dos iões silício e alumínio.

Perante estes resultados conclui-se que o EDX se revela mais eficaz como uma análise qualitativa do que quantitativa, sendo necessário para uma análise quantitativa rigorosa análises complementares como XPS ou análises químicas.

4.2.2. ANÁLISE POR FTIR

A técnica de FTIR foi utilizada com o objetivo de averiguar se a incorporação de iões prata e zinco desencadeava alterações na rede cristalina do zeólito NaY. Na figura 4.12 são apresentados os espectros de FTIR sobrepostos dos zeólitos NaY; AgY 0,025 M; ZnY 0,050 M; ZnAgY 0,025 M e ZnAgY 0,050 M na região de 4000 a 500 cm^{-1} .

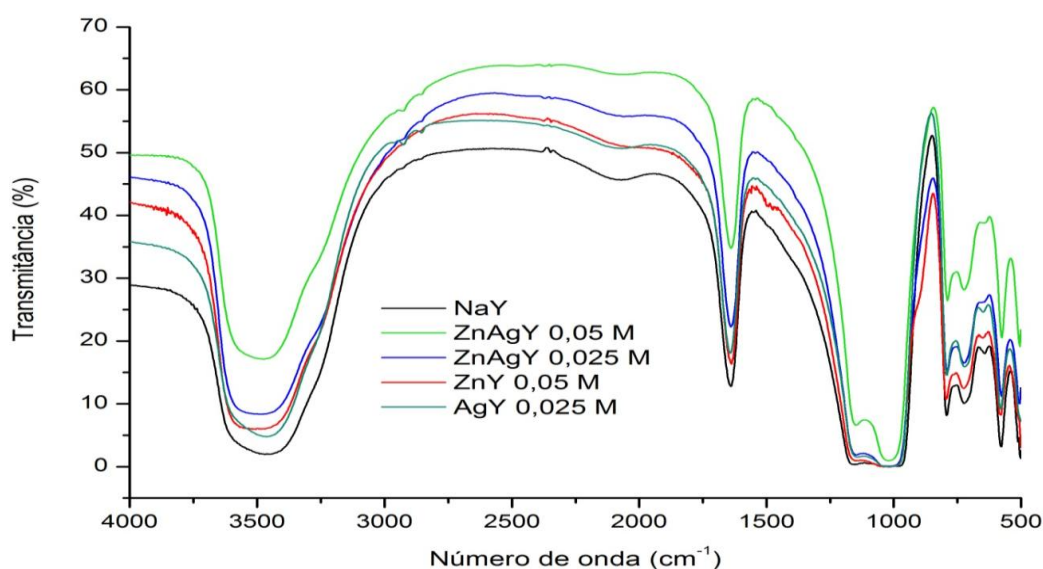


Figura 4.12. Espectros de FTIR de NaY; AgY 0,025 M; ZnY 0,05 M; ZnAgY 0,025 M e ZnAgY 0,05 M.

Através da análise dos espectros de FTIR podemos verificar a presença das bandas características dos zeólitos em todas as amostras. Os espectros são dominados por uma banda larga entre 3700-3200 cm^{-1} devido às vibrações dos grupos hidroxilo da rede e também pelas bandas devidas às vibrações de alongamento T-O-T (T = Si, Al) da rede e que aparecem no intervalo de 1300 a 500 cm^{-1} . Os espectros são ainda caracterizados por uma banda a 1640 cm^{-1} originada pelas vibrações de deformação do grupo OH da água adsorvida [49,59].

A comparação entre os espectros do zeólito Y antes e após permuta iónica demonstra que a introdução de zinco ou prata nas estruturas zeolíticas não provoca desvios ou alargamento das suas bandas características. Desta forma, é possível concluir que a estrutura cristalina dos zeólitos permanece inalterável após o procedimento de permuta iónica, mesmo após a introdução dos dois

metais na estrutura zeolítica. Também através do FTIR é possível determinar a razão de Si/Al da estrutura zeolítica [129,130] que é comparável com as razões obtidas através da análise de XRD. Na tabela 4.8 encontram-se as razões de Si/Al dos zeólitos representados na figura 4.12.

Tabela 4.8. Razões Si/Al determinadas por FTIR das amostras NaY; ZnAgY 0,050 M; ZnAgY 0,025 M; AgY 0,025 M e ZnY 0,050 M.

Amostra	Si/Al
NaY	2,73
ZnAgY 0,050 M	2,61
ZnAgY 0,025 M	2,66
ZnY 0,050 M	2,87
AgY 0,025 M	2,86

Comparando os valores da razão Si/Al obtidos por FTIR e EDS, verifica-se que FTIR é uma técnica mais precisa na determinação deste parâmetro. Os valores obtidos mostram uma diminuição na razão quando são permutados dois metais na estrutura. Entretanto esta diminuição não mostra que houve uma desaluminação do zeólito provocada pela permuta iônica.

4.2.3. ANÁLISE QUÍMICA

A análise das estruturas zeolíticas por espectroscopia de emissão atômica com plasma indutivo acoplado (ICP-AES), tinha por objetivo determinar a quantidade de zinco e prata introduzida nas mesmas por permuta iônica. Os resultados obtidos são apresentados na tabela 4.9.

Tabela 4.9. Percentagem de prata e zinco introduzida nas estruturas zeolíticas.

Amostra	Metal	Valor (%)
AgY 0,010 M	Prata	1,8
AgY 0,025 M	Prata	2,2
ZnY 0,050 M	Zinco	3,9
ZnAgY 0,025 M	Prata	17,0
	Zinco	3,3
ZnAgY 0,050 M	Prata	20,0
	Zinco	2,5

Tendo em consideração os resultados apresentados, verifica-se que os zeólitos bimetálicos (ZnAgY 0,025 M e 0,05 M) possuem percentagens de prata nas suas estruturas significativamente superiores à dos zeólitos monometálicos (AgY 0,01 M e AgY 0,025 M). Por sua vez, o zinco, primeiro íon permutado nos zeólitos bimetálicos, apresenta valores similares ao do zeólito monometálico ZnY 0,05 M.

Segundo Čejka et al. [73], o zeólito Y apresenta diferentes seletividades para os metais de transição existentes. No que diz respeito aos metais de transição em estudo, este zeólito FAU é mais seletivo para os íões prata, seguido de cobre e por último zinco. Por cada íon prata permutado é consumido um íon sódio da estrutura, enquanto que para ser permutado um íon zinco é necessário que saiam dois íões sódios. Perante a maior facilidade de permuta dos íões prata, é de esperar que a percentagem de prata nos zeólitos bimetálicos seja bastante superior à de zinco.

A partir desta análise foi ainda possível determinar o número de átomos de zinco e prata existente por célula unitária (UC) do zeólito, assim como os íões sódio gastos na permuta. Estes resultados são apresentados na tabela 4.10 e foram determinados tendo em consideração a seguinte composição química do zeólito NaY de partida: $\text{Na}_{53}\text{Al}_{53}\text{Si}_{139}\text{O}_{384}$.

Tabela 4.10. Número de Prata e Zinco por célula unitária de zeólito Y.

Amostra	(Na+H)/UC	Ag/UC	Zn/UC	Na permuta/UC
AgY 0,010 M	50,6	2,4	-	2,4
AgY 0,025 M	50,0	3,0	-	3,0
ZnY 0,050 M	35,0	-	9,0	18,0
ZnAgY 0,025 M	20,9	23,1	4,5	32,1
ZnAgY	14,6	27,2	5,6	38,4

4.2.4. ANÁLISE POR XRD

Com o objetivo de verificar se o processo de permuta iónica desencadeou alterações na estrutura cristalina do zeólito Y, foram realizadas análises por difração de raios-X. Na figura 4.13 apresentam-se os difractogramas de raios-X de NaY; AgY 0,025 M; ZnAgY 0,050 M e ZnAgY 0,025 M.

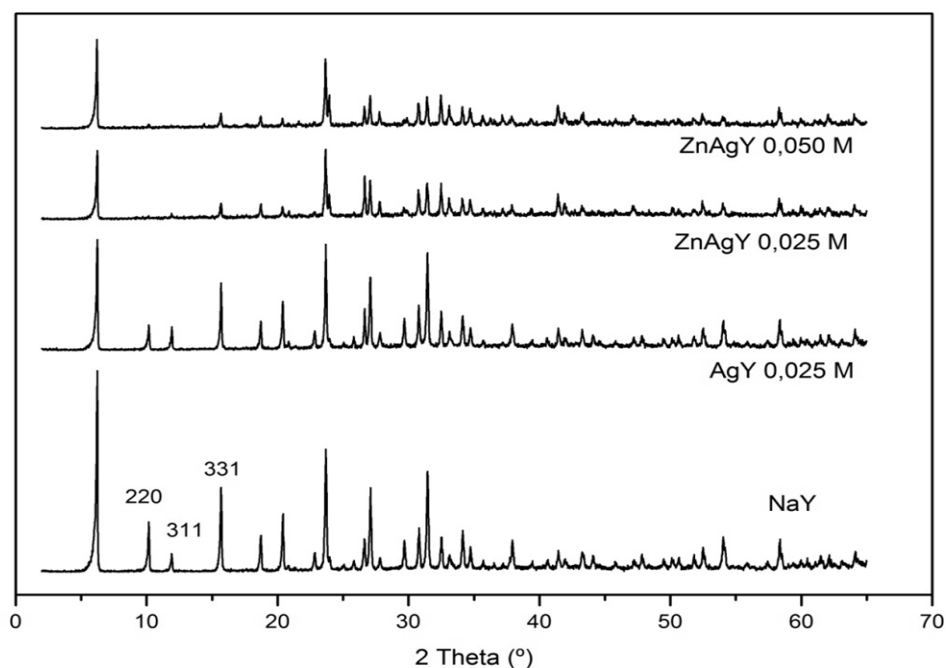


Figura 4.13. Difractogramas de raios-X de NaY; AgY 0,025 M; ZnAgY 0,025 M e ZnAgY 0,050 M.

Os difractogramas dos zeólitos permutados com os diferentes íons apresentam um padrão semelhante ao do difractograma do zeólito de partida (NaY), indicando que a estrutura zeolítica não foi alterada com a introdução dos íons prata e zinco. Entretanto, verifica-se que nos zeólitos bimetalicos há diminuição da intensidade relativa de alguns picos. As diferenças mais significativas residem na intensidade dos picos a $2\theta = 10,1^\circ$; $11,9^\circ$ e $15,6^\circ$ que se referem às reflexões hkl 220, 311 e 331 (assinaladas nas figuras), respectivamente [59].

Quayle Lunsford *et al.* [149,150] relacionaram a intensidade destas reflexões com a posição dos catiões na cavidade e concluíram que a alteração da intensidade está associada à redistribuição dos catiões nas cavidades. Desta forma, as diferenças mais acentuadas nas intensidades de reflexão verificadas para os zeólitos bimetalicos devem-se à troca dos catiões sódio por prata e zinco.

Através da análise por XRD pode-se determinar a cristalinidade relativa, os parâmetros de malha (a_0) e nomeadamente a razão Si/Al das estruturas zeolíticas. Na tabela 4.11 apresentam-se os valores determinados para as diferentes amostras.

Tabela 4.11. Informação estrutural das amostras obtidas por XRD

Amostra	a_0	(Si/Al) rede	Cristalinidade (%)
NaY	24,65	2,63	100
AgZnY 0,050 M	24,65	2,60	77
ZnAgY 0,025	24,65	2,64	40
ZnAgY 0,050	24,66	2,54	35
AgY 0,025	24,63	2,83	86

De acordo com a informação estrutural obtida, verifica-se que há alterações significativas na cristalinidade do zeólito Y. Este parâmetro foi determinado considerando o NaY como padrão, isto é como sendo 100 % cristalino. As situações em que se verifica uma diminuição mais acentuada da cristalinidade dizem respeito aos zeólitos bimetalicos. Esta análise também confirma os resultados obtidos por FTIR e análise química, em que não se verifica uma desaluminação do zeólito após os tratamentos.

4.2.5. AVALIAÇÃO DAS PROPRIEDADES ANTIMICROBIANAS

A atividade antimicrobiana de ZnAgY 0,025 e 0,050 M e de AgY 0,025 M foi avaliada utilizando *E. coli*, *B. subtilis*, *C. albicans* e *S. cerevisiae* como microrganismos indicadores de sensibilidade. Neste ensaio testou-se a gama de concentrações de 0,01 a 2 mg/mL, sendo avaliada a atividade antimicrobiana assim como o valor de MIC para cada zeólito em estudo.

Nas figuras seguintes são apresentados os resultados dos ensaios antimicrobianos obtidos para cada microrganismo. Numa primeira análise dos mesmos, verifica-se que os materiais ZnAgY 0,025 M e ZnAgY 0,05 M demonstraram-se agentes antimicrobianos mais eficientes do que AgY 0,025 M; tanto contra as bactérias como as leveduras.

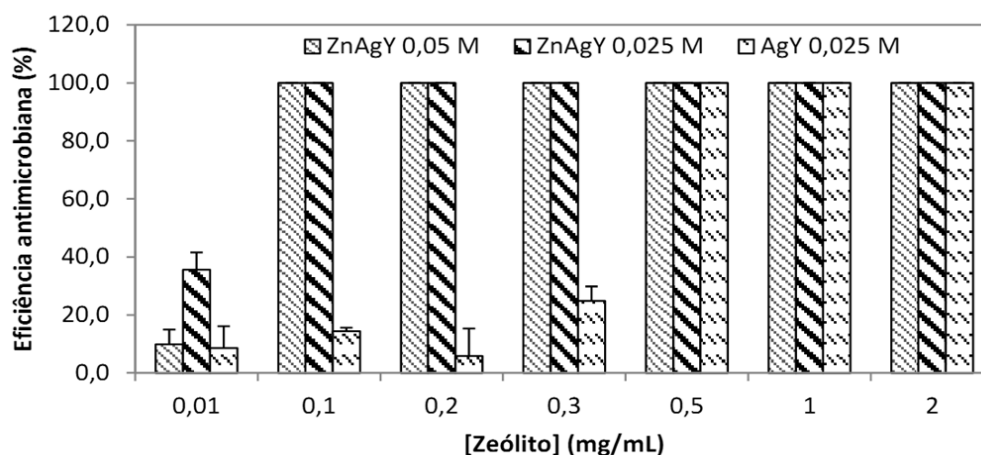


Figura 4.14. Eficiência antimicrobiana (%) dos zeólitos AgY 0,025 M; ZnAgY 0,025 M e ZnAgY 0,050 M contra *E. coli*. A eficiência antimicrobiana foi determinada tendo em consideração o número de UFC observadas para o zeólito Y e para o mesmo zeólito permutado com os diferentes íons metálicos. As barras de erro apresentadas correspondem ao desvio padrão de três réplicas.

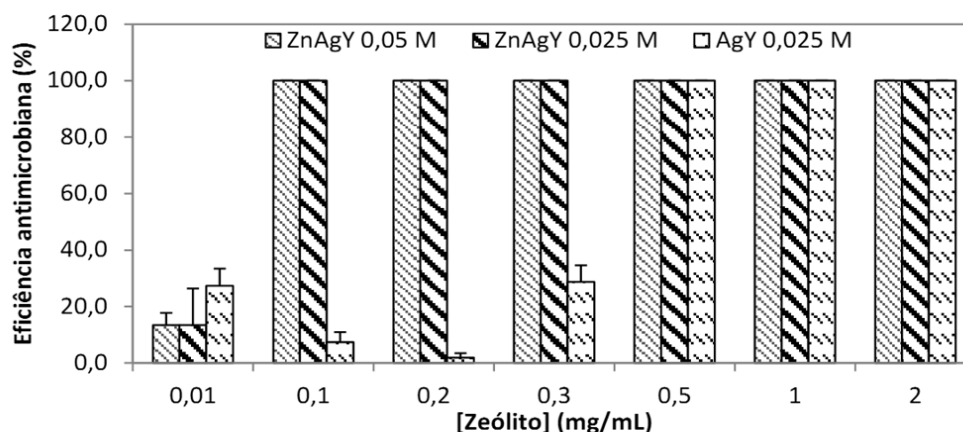


Figura 4.15. Eficiência antimicrobiana (%) dos zeólitos AgY 0,025 M; ZnAgY 0,025 M e ZnAgY 0,050 M contra *B. subtilis*. A eficiência antimicrobiana foi determinada tendo em consideração o número de UFC observadas para o zeólito Y e para o mesmo zeólito permutado com os diferentes íons metálicos. As barras de erro apresentadas correspondem ao desvio padrão de três réplicas.

Como é possível verificar pelas figuras 4.14 e 4.15, os zeólitos ZnAgY 0,050 M e 0,025 M apresentam 100 % de eficiência antimicrobiana a concentrações iguais ou superiores a 0,1 mg/mL. Ou seja, esta é a concentração mínima inibitória para o qual não se verifica a presença de células viáveis de *E. coli* nem de *B. subtilis*. No caso do AgY 0,025 M o valor de MIC é de 0,5 mg/mL para ambas as bactérias.

Seria de esperar que o aumento gradual da concentração de zeólito modificado conduzisse a um aumento proporcional da eficiência antimicrobiana. Contudo, analisando as figuras de eficiência antimicrobiana contra *E. coli* e *B. subtilis* verifica-se que existe oscilação na percentagem de eficiência antimicrobiana na gama de concentrações testadas. Esta oscilação deriva da diferença do número de colónias contabilizado para as respetivas concentrações nas diluições 1:10000 e 1:100000. Estas oscilações podem dever-se ao volume da gota colocado em cada placa e da homogeneidade da solução da qual se retira essa gota. Apesar disto, verificou-se que após ter sido encontrado o MIC para cada microrganismo os materiais apresentavam sempre o mesmo comportamento, isto é, 100 % de eficiência antimicrobiana. Na figura 4.16 são apresentadas, como exemplo, imagens de placas de Petri onde foram incorporados os materiais NaY e AgY 0,025 M em diferentes concentrações. Nessas placas foram colocadas gotas da suspensão celular das bactérias *E. coli* e *B. subtilis*.

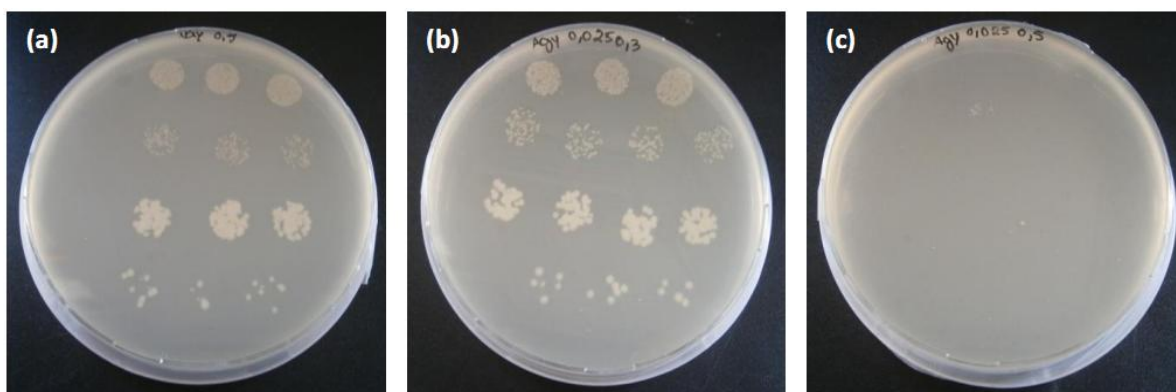


Figura 4.16. Ensaio para avaliação do potencial antimicrobiano contra *E. coli* (1ª e 2ª fila de cada placa) e *B. subtilis* (3ª e 4ª fila) do zeólito NaY 0,5 mg/mL (a); AgY 0,025 M 0,3 mg/mL (b) e AgY 0,025 M 0,5 mg/mL (c).

Através da figura 4.16, é possível visualizar que no meio de cultura incorporado com o MIC do material em estudo (condição c) não se verifica a presença de unidades formadoras de colônias.

Pela observação das figuras 4.17 e 4.18, verifica-se que as leveduras se mostraram menos sensíveis à atividade antimicrobiana dos materiais em estudo. Para os materiais ZnAgY 0,025 M e 0,050 M o MIC determinado foi de 0,3 mg/mL; enquanto para AgY 0,025 M foi de 2 mg/mL. Estes valores de MIC indicam que são necessárias maiores quantidades destes três materiais para inibir o crescimento das leveduras e, que a conjugação dos metais favorece a inibição do crescimento celular provavelmente por existir algum tipo de sinergia entre ambos. Comparando estes resultados com os obtidos por ZnAgY 0,01 M e AgY 0,01 M (tabela 4.6), em que apenas para o primeiro foi determinado um MIC de 2 mg/mL, verifica-se que o aumento da concentração das soluções de permuta foi eficaz no aumento das propriedades antimicrobianas.

Na avaliação destes resultados, também tem de se ter em consideração que o material AgY 0,025 M possui uma percentagem de prata bastante inferior às de ZnAgY, tal como demonstrado pelos resultados da análise química, daí o valor de MIC encontrado ser bastante superior ao do ZnAgY.

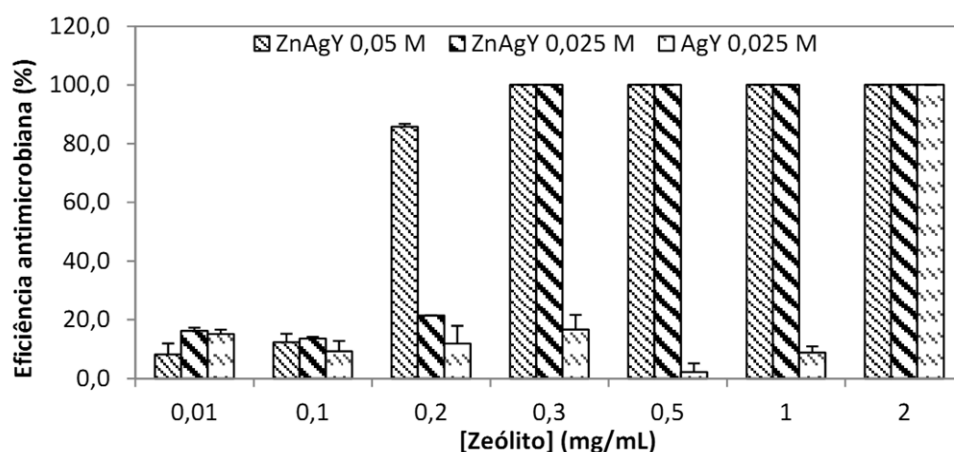


Figura 4.17. Eficiência antimicrobiana (%) dos zeólitos AgY 0,025 M; ZnAgY 0,025 M e ZnAgY 0,050 M contra *S. cerevisiae*. A eficiência antimicrobiana foi determinada tendo em consideração o número de UFC observadas para o zeólito Y e para o mesmo zeólito permutado com os diferentes íons metálicos. As barras de erro apresentadas correspondem a três réplicas.

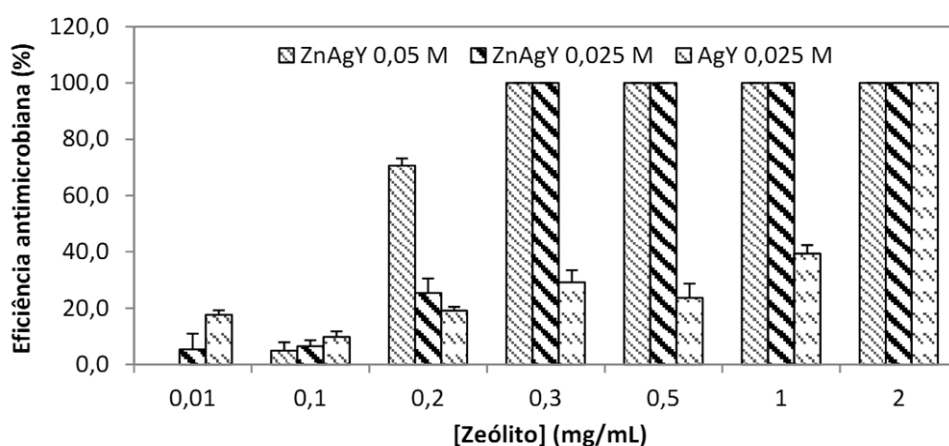


Figura 4.18. Eficiência antimicrobiana (%) dos zeólitos AgY 0,025 M; ZnAgY 0,025 M e ZnAgY 0,050 M contra *C. albicans*. A eficiência antimicrobiana foi determinada tendo em consideração o número de UFC observadas para o zeólito Y e para o mesmo zeólito permutado com os diferentes íons metálicos. As barras de erro apresentadas correspondem a três réplicas.

De acordo com estes resultados, observa-se que é necessário utilizar menores concentrações dos materiais ZnAgY 0,025 M e 0,050 M para inibir o crescimento dos microrganismos em estudo (menores valores de MIC), tanto no caso das bactérias (0,1 mg/mL) como das leveduras (0,3 mg/mL). Tendo em consideração o modo de preparação dos dois materiais, os resultados da caracterização morfológica e estrutural, bem como os seus efeitos antimicrobianos, o ZnAgY 0,025 M apresentou-se como o material mais viável pra ser incorporado nos filmes poliméricos.

4.3. FILMES POLIMÉRICOS

Após a preparação, caracterização estrutural e morfológica e avaliação dos efeitos antimicrobianos dos zeólitos monometálicos e bimetálicos, o principal objetivo foi a incorporação desses materiais em polietileno, matriz escolhida para a preparação dos filmes. Os maiores desafios na preparação dos filmes compósitos é a obtenção de materiais homogêneos e com atividade antimicrobiana.

Tendo em consideração os resultados dos ensaios relativos ao potencial antimicrobiano dos zeólitos monometálicos e bimetálicos, anteriormente apresentados, pensar-se-ia que os materiais ZnAgY 0,025 e 0,050 M, quando incorporados em polietileno, seriam aqueles com maior probabilidade de continuarem a manifestar atividade antimicrobiana. De forma a poder comparar e confirmar os resultados das propriedades antimicrobianas desses materiais, preparam-se compósitos incorporando outros dos zeólitos preparados. Como referido no procedimento experimental, numa primeira fase preparam-se compósitos com 5 % (p/p) dos seguintes materiais: NaY; AgY 0,025 M; ZnY 0,050 M; AgY 0,050 M; ZnAgY 0,025 M e ZnAgY 0,050 M.

A fim de averiguar se estes materiais possuíam atividade antimicrobiana, desenvolveu-se o teste de difusão em placa. Neste teste utilizou-se o polietileno e filme compósito de NaY como controlos. Os resultados antimicrobianos demonstraram que apenas os filmes compósitos nos quais foi incorporado AgY 0,050 M; ZnAgY 0,025 M e ZnAgY 0,050 M apresentaram atividade antimicrobiana. Perante tal, decidiu-se otimizar estes materiais e preparar filmes compósitos com 1, 3 e 5% (p/p) dos mesmos.

Como estes filmes compósitos foram preparados recorrendo a um almofariz de ágata, obtiveram-se filmes compósitos mais espessos no centro e finos nas bordas. Este gradiente de concentrações das partículas zeolíticas no polímero foi obtido após o compósito ser submetido à temperatura de 190 °C numa prensa SPECAC. Esta temperatura permite a fusão do polímero e não da carga, e portanto esperar-se-ia a obtenção de um filme homogêneo. Como tal não ocorreu, possivelmente a concentração de material na zona central do filme compósito pode estar relacionada com a polaridade dos diferentes materiais utilizados. O zeólito apresenta-se como um material polar e o polietileno apolar, havendo assim uma grande atração entre estes [3]. Contudo quando se experimentou com polipropileno, um polímero mais polar, verificou-se que o material se dispersava de igual forma. Assim, seria necessário em fases posteriores otimizar o método de preparação. Além disso, verificou-se que todos os filmes compósitos que possuíam prata ficaram com uma tonalidade amarela, sendo esta cada vez mais escura nos que apresentavam maior percentagem de zeólito. O aspeto dos materiais obtidos é apresentado na figura 4.19.

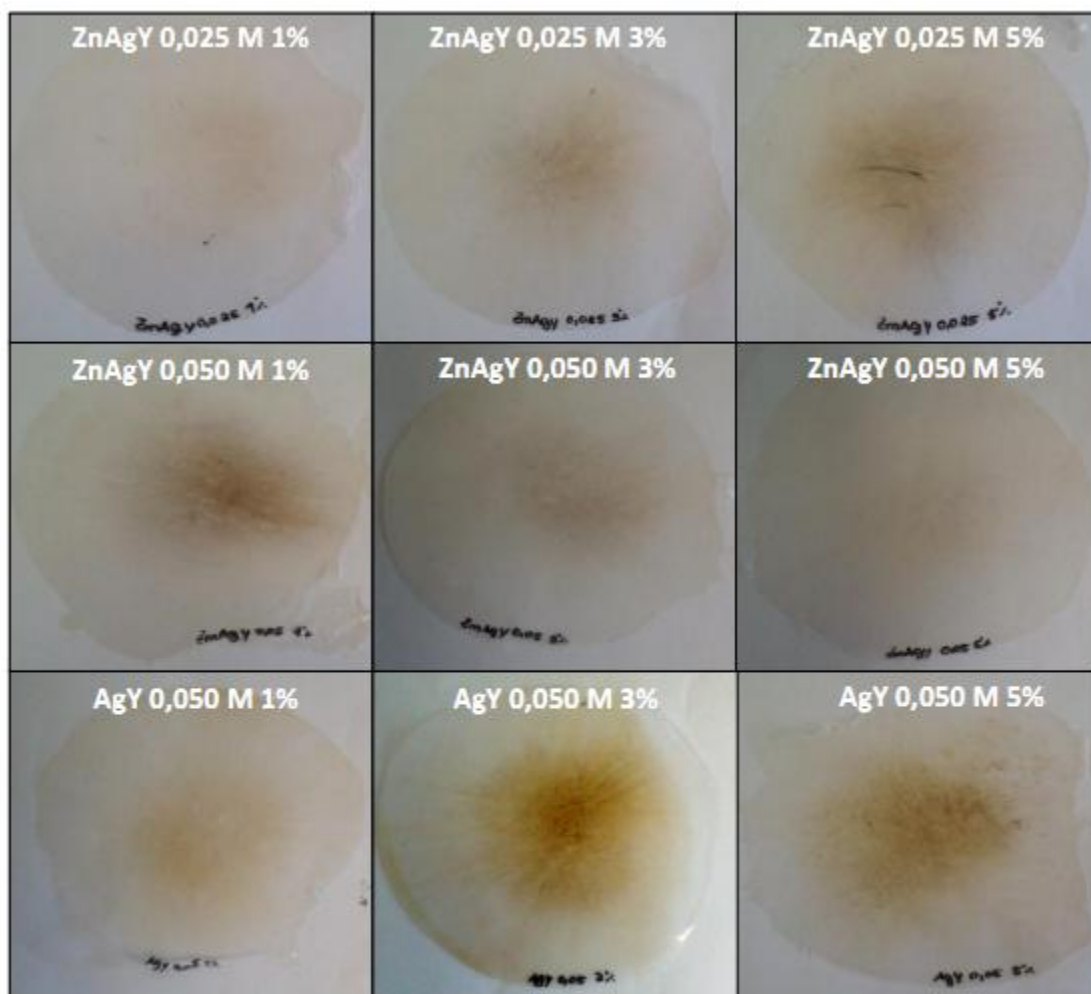


Figura 4.19. Aspetto dos filmes compósitos preparados a partir de ZnAgY 0,025 M 1%,3% e 5% (p/p); ZnAgY 0,050 M 1%, 3% e 5% (p/p) e de AgY 0,050 M 1%, 3% e 5% (p/p).

Os materiais apresentados foram caracterizados por SEM e FTIR e foram sujeitos a ensaios para avaliação das suas propriedades antimicrobianas.

4.3.1. ANÁLISE POR SEM

A distribuição das partículas zeolíticas nos filmes compósitos foi estudada através de SEM. Para a obtenção das micrografias de SEM foram analisadas as zonas mais espessas dos filmes compósitos, contudo para aquele com 3% de ZnAgY 0,025 M foi analisada a zona mais fina e a mais espessa.

Na figura 4.20 são apresentadas as micrografias do filme compósito com 1, 3 (zona espessa e zona fina) e 5 % de ZnAgY 0,025 M

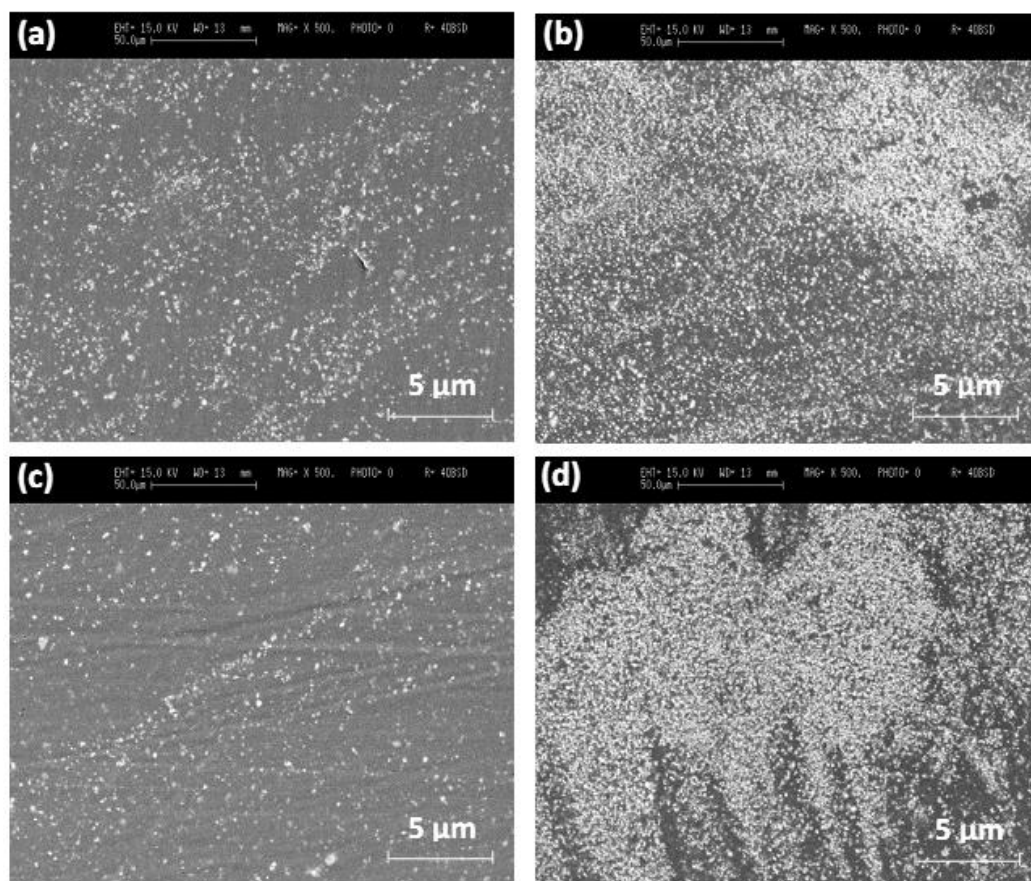


Figura 4.20. Micrografias de SEM do filme compósito com 1 % ZnAgY 0,025 M (a), zona espessa de 3% ZnAgY 0,025 M (b) zona fina de 3% ZnAgY 0,025 M (c) e 5 % de ZnAgY 0,025 M (d).

De acordo com as micrografias de SEM verifica-se que as partículas zeolíticas não se encontram distribuídas de forma homogênea no polímero. Comparando os resultados de (a) e (d), da figura 4.20, é notória a diferença na quantidade de material presente nos filmes compósitos com menor (1%) e maior (5%) percentagem de zeólito. No que diz respeito ao filme compósito com 3 % de ZnAgY 0,025 M, verifica-se que na zona mais fina (figura 4.20 c) as partículas zeolíticas encontram-se em menor quantidade e mais dispersas comparativamente à zona espessa do mesmo filme compósito (figura 4.20 b).

4.3.2. ANÁLISE POR FTIR

A análise por FTIR dos filmes compósitos foi realizada com o intuito de verificar se tinham ocorrido alterações na estrutura cristalina do polietileno e de comprovar a presença dos zeólitos. Na figura 4.21 apresentam-se os espectros de FTIR na região de 4000 a 400 cm^{-1} (Figura 4.21 - I) e na região de 1750-500 cm^{-1} (Figura 4.21 - II) das zonas mais espessas dos filmes compósitos com 1, 3 e 5

% (p/p) do zeólito bimetalico ZnAgY 0,025 M, assim como os espectros do polímero e do zeólito de partida.

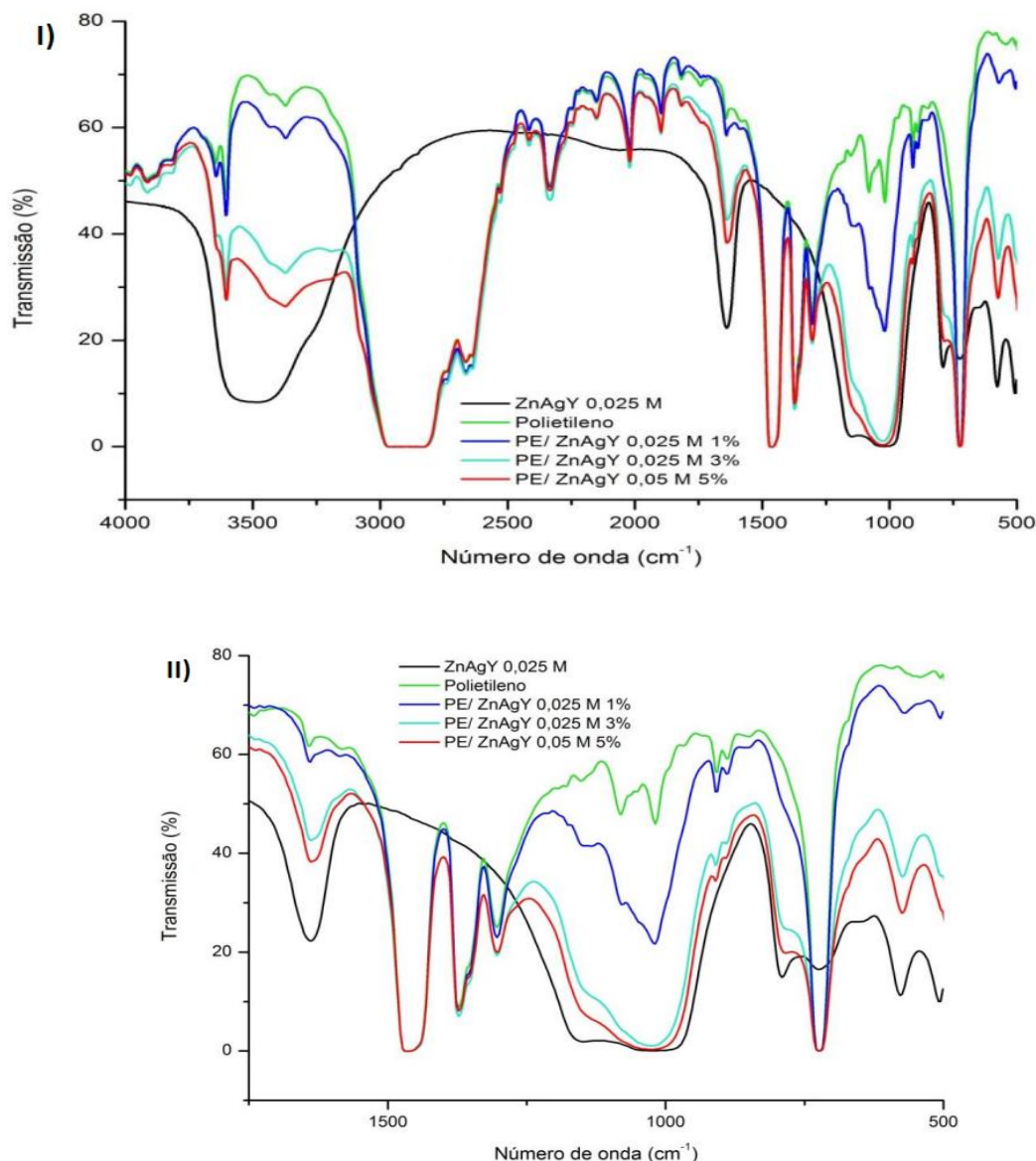


Figura 4.21. Espectros de infravermelho das zonas mais espessas dos filmes compósitos com 1, 3 e 5 % (p/p) de ZnAgY 0,025 M; polietileno e ZnAgY 0,025 M: (I) região de 4000-400 cm^{-1} e (II) região 1750-500 cm^{-1} .

Na figura 4.22 são apresentadas exatamente as mesmas amostras, nas mesmas condições, mas na zona mais fina dos filmes compósitos. Nos espectros de FTIR das figuras 4.21 (I) e 4.22 (I) verifica-se a presença das bandas características de polietileno para todos os filmes compósitos preparados. Os espectros são dominados por uma banda larga entre 3000-2700 cm^{-1} devida aos estiramentos vibracionais típicos das ligações C-H, uma banda por volta de 1470 cm^{-1} originada pelas vibrações de deformação C-H e uma banda por volta de 730 cm^{-1} relativa as vibrações angulares dos grupos metilo. Desta forma, verifica-se que independentemente da percentagem de zeólito incorporada em polietileno este mantém a sua integridade estrutural [131,132].

Relativamente à presença das partículas zeolíticas nos filmes compósitos, verifica-se que esta é mais notória nos espectros das zonas espessas (Figura 4.21 - I e II), devido à presença de maiores quantidades de material. Principalmente na região de $1750\text{-}500\text{ cm}^{-1}$ (figura 4.21 e 4.22 - II) são perceptíveis as bandas características dos zeólitos por volta de 1640 , 1000 e de 750 cm^{-1} especialmente para os compósitos com 3 e 5% de zeólito.

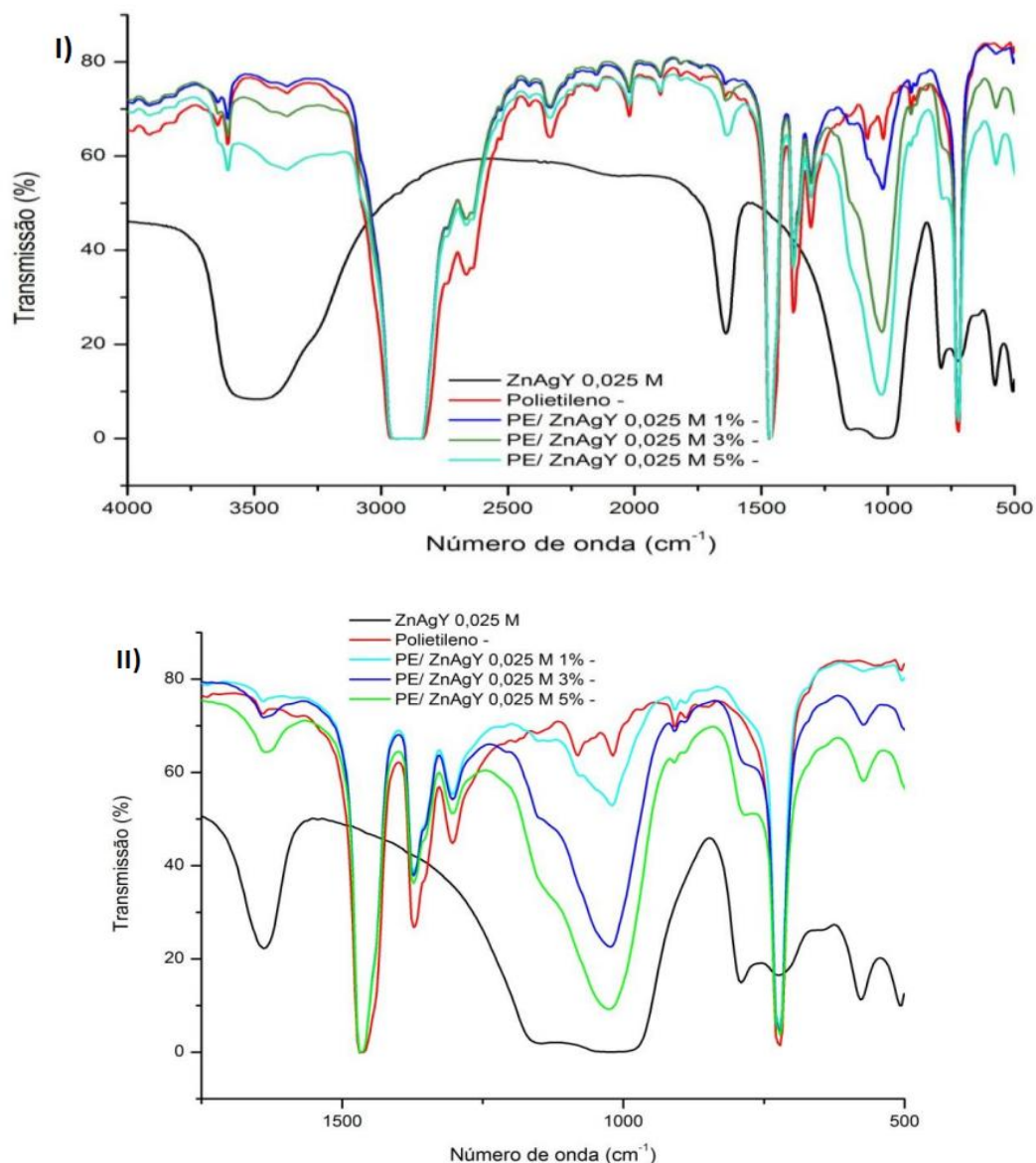


Figura 4.22. Espectros de infravermelho das zonas mais finas dos filmes compósitos com 1, 3 e 5 % de ZnAgY 0,025 M; polietileno e ZnAgY 0,025 M: (I) região de $4000\text{-}400$ e (II) região $1750\text{-}500\text{ cm}^{-1}$.

Numa embalagem é importante que esta possua resistência mecânica, contudo não foi feita a caracterização mecânica destes filmes compósitos devido a não se encontrarem perfeitamente homogêneos.

4.3.3. AVALIAÇÃO DAS PROPRIEDADES ANTIMICROBIANAS DOS FILMES COMPÓSITOS

De forma a avaliar atividade antimicrobiana dos filmes compósitos foram realizados testes de suscetibilidade de difusão em placa. O material em estudo apresenta atividade antimicrobiana se houver formação de uma zona isenta de crescimento microbiano à sua volta, traduzindo-se na formação de um halo de inibição do crescimento.

Como os filmes compósitos preparados não eram materiais homogêneos, cortaram-se discos de 6 mm de diferentes zonas - espessa (E), intermédia (I) e fina (F) - a fim de ter uma ideia mais consistente sobre as suas propriedades antimicrobianas. Os resultados obtidos para os microrganismos *E. coli*, *B. subtilis*, *C. albicans* e *S. cerevisiae* encontram-se representados na tabela 4.12.

Tabela 4.12. Dimensão dos halos de inibição de crescimento (em mm) obtidos para os diferentes filmes compósitos. (HT-significa halo turvo)

Material	(Dimensão do Halo em mm)											
	<i>E. coli</i>			<i>B. subtilis</i>			<i>C. albicans</i>			<i>S. cerevisiae</i>		
	E	I	F	E	I	F	E	I	F	E	I	F
PE	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
PE +NaY	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
AgY 0,050 M 1%	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
AgY 0,050 M 3%	7	0	0	6,5	0	0	7,5	0	0	HT	HT	HT
AgY 0,050 M 5%	8	8	0	7	7	0	8,5	8,5	0	HT	HT	HT
ZnAgY 0,025 M 1%	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
ZnAgY 0,025 M 3%	7	0	0	7	0	0	8	0	0	HT	HT	HT
ZnAgY 0,025 M 5%	8	7	0	7	0	0	10	0	0	HT	HT	HT
ZnAgY 0,050 M 1%	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
ZnAgY 0,050 M 3%	7	0	0	6	0	0	8	0	0	HT	HT	HT
ZnAgY 0,050 M 5%	9	7	0	9	0	0	9	8	0	HT	HT	HT

De forma a poder validar a atividade antimicrobiana dos filmes compósitos preparados, utilizou-se o filme de polietileno sozinho e incorporado com NaY como controlos. Estes materiais, tal como demonstram os resultados apresentados na tabela 4.12, por si só não apresentam atividade antimicrobiana (não se verifica a formação de halos).

Relativamente aos filmes compósitos em estudo, verifica-se que a incorporação de 1% de zeólito (monometálico ou bimetálico) em polietileno não é suficiente para prevenir o crescimento dos microrganismos testados, uma vez que não há formação de halos (0 mm). Por sua vez, nos compósitos com 3 e 5 % de zeólito verifica-se a formação de halos, isto é, não há crescimento celular. Também se verificou que as zonas mais finas (F) dos filmes compósitos com 3 e 5 % não apresentaram atividade antimicrobiana, uma vez que as análises de SEM e FTIR demonstraram que

estas zonas possuíam pouco zeólito. Por sua vez, as zonas mais espessas destes compósitos apresentaram sempre atividade. Relativamente aos microrganismos, verificou-se a formação de halos de maiores dimensões na presença de *E. coli* e *C. albicans*. A *S. cerevisiae* foi o único microrganismo para o qual não se conseguiu verificar a formação de halos, pois estes estavam muito turvos.

Na figura 4.24 são apresentadas, como exemplo, placas de Petri inoculadas com *C. albicans* nos quais são colocados os discos das diferentes zonas dos filmes compósitos AgY 0,050 M, ZnAgY 0,050 M e ZnAgY 0,025 M nas percentagens de 1, 3 e 5 % (p/p).

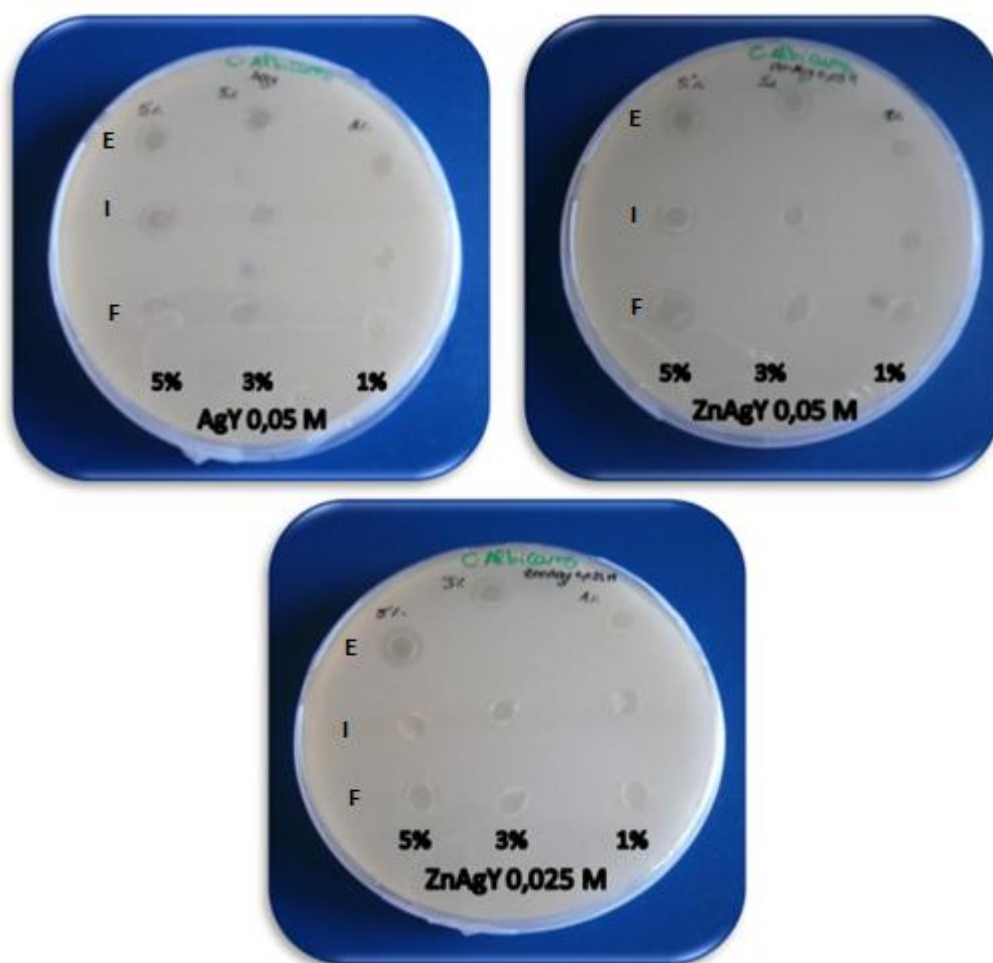


Figura 4.23. Placas de Petri inoculadas com *C. albicans* nos quais foram colocados os discos das diferentes zonas de espessura dos filmes compósitos AgY 0,050 M, ZnAgY 0,050 M e ZnAgY 0,025 M nas percentagens de 1, 3 e 5 % (p/p).

Na tabela 4.13 apresentam-se os resultados do ensaio de suscetibilidade de difusão em placa de uma forma mais simplificada, onde sinal (-) significa inibição de crescimento e (+) significa crescimento microbiano. Os resultados apresentados dizem respeito às zonas mais espessas dos filmes compósitos com 1, 3 e 5 % (p/p) de zeólito.

Tabela 4.13. Tabela resumo dos resultados de suscetibilidade microbiana obtidos pelo teste de difusão em placa para as zonas mais espessas dos filmes compósitos com 1, 3 e 5 % (p/p) de zeólito. (-) Inibição de crescimento e (+) presença de crescimento microbiano.

Filme compósito	Porcentagem de zeólito incorporado		
	1%	3%	5%
PE	+	+	+
PE + NaY	+	+	+
PE + AgY 0,050 M	+	-	-
PE + ZnAgY 0,025 M	+	-	-
PE + ZnAgY 0,050 M	+	-	-

Tal como referido anteriormente, PE por si só não apresenta propriedades antimicrobianas. O mesmo acontece com o filme compósito no qual foi incorporado o zeólito NaY, isto é o zeólito de partida. Apenas os filmes compósitos com 3 e 5 % (p/p) de AgY 0,05 M, ZnAgY 0,025 M e ZnAgY 0,05 M apresentaram propriedades antimicrobianas.

Capítulo 5

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Este trabalho tinha como objetivo desenvolver embalagens poliméricas com propriedades antimicrobianas, utilizando para tal zeólitos permutados com um ou uma mistura de íões metálicos - prata, cobre e zinco - incorporado(s) em filmes de polietileno. Perante os resultados obtidos é possível afirmar que o propósito do presente trabalho foi cumprido. De entre todos os resultados destacam-se as seguintes conclusões:

Os resultados de XPS das amostras AgX e AgY (Zeólitos X e Y permutados com nitrato de prata 0,050 M) foram essenciais para a seleção do análogo da estrutura faujasite a utilizar em todo o trabalho experimental. De acordo com o parâmetro de Auger determinado por XPS, a prata superficial em AgX encontrava-se no estado metálico, enquanto em AgY esta se encontrava no estado iónico. A diferença no estado de oxidação da prata levou a que os dois análogos apresentassem comportamentos diferentes a nível do seu potencial antimicrobiano. Esta diferença é mais notória quando se usaram as bactérias (*E. coli* e *B. subtilis*) como microrganismos indicadores de sensibilidade, para as quais não foram detetadas quaisquer células viáveis na presença de AgX na concentração de 0,3 mg/mL e de AgY na concentração de 0,2 mg/mL. Em relação às leveduras, o valor de MIC foi de 1 mg/mL para ambos os zeólitos. Perante as propriedades antibacterianas do zeólito Y, esta foi a estrutura selecionada para ser utilizada no restante procedimento experimental.

Os ensaios antimicrobianos preliminares realizados com os zeólitos monometálicos e bimetálicos, preparados pelo procedimento de permuta iónica do zeólito Y com solução de nitrato de prata 0,010 M, nitrato de cobre 0,010 M e nitrato de zinco 0,050 M, determinaram que os zeólitos monometálicos não foram capazes de inibir nenhum dos microrganismos em estudo, ao contrário dos zeólitos bimetálicos. Nas bactérias (*E. coli* e *B. subtilis*) os pares AgCuY, AgZnY, CuAgY apresentaram um MIC de 1 mg/mL, enquanto o par ZnAgY apresentou um MIC de 0,5 mg/mL. Por sua vez, nas leveduras (*C. albicans* e *S. cerevisiae*), apenas para os pares AgZnY e ZnAgY se detectou atividade antimicrobiana, apresentando um MIC de 2 mg/mL. A análise dos valores de MIC demonstraram que as propriedades antimicrobianas destes materiais estão dependentes da concentração das soluções de metais utilizadas na sua preparação, da ordem pela qual os íões são permutados e também dos microrganismos em estudo. Tendo em consideração estes resultados, optou-se por estudar a variação da concentração de prata (0,025 M e 0,05 M) para uma concentração constante de zinco 0,05M.

As análises de SEM e FTIR dos zeólitos monometálicos (AgY 0,025 M e ZnY 0,05 M) e bimetálicos (ZnAgY 0,025 M e ZnAgY 0,05 M) permitiram concluir que a presença de prata e zinco na estrutura zeolítica, independentemente da concentração das soluções utilizadas, não possui qualquer efeito na integridade morfológica e estrutural dos zeólitos. Por sua vez, as análises químicas

demonstraram que o zeólito Y é mais seletivo para a prata do que para os íons cobre e zinco. Por último, a análise por XRD demonstrou que nos zeólitos bimetalicos há uma diminuição mais acentuada da cristalinidade, provavelmente devido à redistribuição dos cátions prata e zinco nas suas cavidades. Os ensaios antimicrobianos desenvolvidos com os materiais AgY 0,025 M, ZnAgY 0,025 M e ZnAgY 0,05 M mostraram que os zeólitos bimetalicos foram mais eficazes na inibição do crescimento dos microrganismos em estudo, provavelmente devido à sinergia existente entre os íons prata e zinco. Para ZnAgY 0,025 M e 0,05 M, o MIC determinado foi de 0,1 mg/mL para as bactérias e de 0,3 mg/mL para as leveduras. Por sua vez, AgY 0,025 M exibiu um valor de MIC de 0,5 mg/mL para as bactérias e de 2 mg/mL para as leveduras.

As amostras ZnAgY 0,025 M, ZnAgY 0,05 M e AgY 0,05 M foram incorporados em filmes de polietileno nas percentagens de 1, 3 e 5 % (p/p). O aspeto dos filmes preparados mostrou que a mistura do polímero e zeólito com recurso a um almofariz de ágata e à fusão à temperatura de 190 °C numa prensa SPECAC, não permite a distribuição homogênea dos zeólitos, tal como demonstrado por SEM. Por sua vez, a análise de FTIR permitiu verificar que não há alteração das propriedades estruturais de PE após inclusão das estruturas zeolíticas. Relativamente às propriedades antimicrobianas dos filmes compósitos, verificou-se a formação de halos de inibição essencialmente para a zona mais espessa dos filmes compósitos com 3 e 5% das amostras. No que diz respeito aos microrganismos, *S. cerevisiae* foi o único microrganismo para o qual os filmes compósitos não induziram a formação de halos de inibição de crescimento.

Capítulo 6

Perspetivas futuras

Os resultados obtidos neste trabalho experimental deixaram em aberto algumas linhas de investigação para o aperfeiçoamento dos filmes compósitos com propriedades antimicrobianas. Assim, de seguida, apresentam-se algumas sugestões de trabalho futuro.

O zeólito Y foi selecionado como recetor de iões metálicos com propriedades antimicrobianas, tendo em consideração resultados de caracterização por XPS, análises químicas e também de ensaios de avaliação da atividade antimicrobiana. Apesar de esta estrutura se ter demonstrado eficiente na sua função, seria interessante testar estruturas zeolíticas de menores dimensões, como é o caso dos zeólitos *Linde Type L* (LTL) e ZSM5, pois estas permitiriam uma difusão ainda mais controlada dos iões metálicos.

No primeiro ensaio realizado com os zeólitos monometálicos e bimetálicos, apenas as amostras ZnAgY e AgY foram selecionadas para fases posteriores de otimização, caracterização e avaliação de propriedades antimicrobianas, devido à melhor atividade antimicrobiana apresentada. Perante tal, seria importante otimizar as concentrações de cobre e de zinco de forma a melhorar a atividade antimicrobiana dos materiais.

Relativamente aos filmes compósitos, e tendo em consideração a problemática da poluição ambiental, poderia utilizar-se polímeros com maiores taxas de degradação, em vez de polietileno. Ainda sobre os compósitos, a fase de preparação dos mesmos poderia ser otimizada com recurso a misturadores mecânicos como *hacke* e mini-extrusora. Após a obtenção de filmes compósitos homogêneos, isto é, no qual os zeólitos estivessem perfeitamente distribuídos, poderiam efetuar-se análises mecânicas e térmicas a fim de avaliar a resistência dos compósitos. Além disso, pensado numa etapa posterior de comercialização do produto seria necessário realizar testes de migração dos iões metálicos incorporados nos zeólitos para os alimentos, a fim de verificar se os valores de migração se encontravam dentro dos limites permitidos por lei.

A atividade antimicrobiana dos filmes compósitos foi avaliada através da utilização das bactérias *E. coli* e *B. subtilis* e das leveduras *C. albicans* e *S. cerevisiae* como microrganismos indicadores de sensibilidade. Estes microrganismos não se encontram diretamente relacionados com contaminações alimentares, principalmente *C. albicans*, porém fornecem uma boa perspetiva sobre a atividade antimicrobiana do material. Após ser finalizado o processo de preparação dos filmes compósitos, os ensaios de atividade antimicrobiana poderiam ser realizados com microrganismos patogénicos associados a alimentos, tais como *Listeria*, *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella* e *Campylobacter*.

Por último, poderiam ser efetuados estudos relativos ao mecanismo de ação dos zeólitos permutados com os iões prata, cobre e zinco. Isto é, dever-se-ia estudar se os iões permutados atuam apenas a nível da membrana e desencadeiam cascatas de sinalização que acionam os

mecanismos de morte celular, ou se estes conseguem penetrar no citoplasma das células e interagir diretamente com o DNA ou outros alvos celulares. A utilização de microrganismos como *E. coli* e *S. cerevisiae* é particularmente útil neste contexto, pois os genomas destes microrganismos modelo encontram-se já sequenciados.

Capítulo 7

Referências bibliográficas

- [1] Brody, A.L., Bugusu, B., Han, J.H., Sand, C.K., McHugh, T.H., *Journal of Food Science*, 73 (2008) 107-116.
- [2] Rosca, L.D., Vergnaud, J.M., *Journal of Chemical Health and Safety*, 14 (2007) 14-20.
- [3] Duncan, T.V., *Journal of Colloid and Interface Science*, 363 (2011) 1-24.
- [4] Restuccia, D., Spizzirri, U.G., Parisi, O.I., Cirillo, G., Cursio, M., Lemma, F., Puoci, F., Vinci, G., Picci, N., *Food control*, 21 (2010) 1425-1435.
- [5] Suppakul, P., Miltz, J., Sonneveld, K., Bigger, S.W., *Journal of Food Science*, 68 (2003) 408-420.
- [6] Bastarrachea, L., Dhawan, S., Sablani, S.S., *Food Engineering Reviews*, 3 (2011) 79-93.
- [7] Gutiérrez, L., Sánchez, C., Battle, R., Nerín, C., *Trends in Food Science and Technology*, 20 (2009) 92-99.
- [8] Yam, K.L., *The wiley: Encyclopedia of packaging technology*, 3ª edição, John Wiley & sons, United States of America, 2009.
- [9] Jokar, M., Rahman, A., Ibrahim, N.A., Abdullah, L.C., Tan, C.P., *Food and Bioprocess Technology*, 5 (2012) 719-728.
- [10] Santiago-Silva, P., Soares, N.F.F., Nóbrega, J.E., Júnior, M.A.W., Barbosa, K.B.F., Volp, A.C.P., Zerdas, E.R.M.A., Wurlitzer, N.J., *Food Control*, 20 (2009) 85-89.
- [11] Vermeiren, L., Devlieghere, F., Debevere, J., *Food additives and Contaminants*, 19 (2002) 163-171.
- [12] Dutta, P.K., Tripathi, S., Mehrotra, G.K., Dutta J., *Food Chemistry*, 114 (2009) 1173-1182.
- [13] Tankhiwale, R., Bajpai, S.K., *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 90 (2012) 16-20.
- [14] Loureiro, V., *Food Research International*, 33 (2000) 247-256.
- [15] Goretti, M., Turchetti, B., Buratta, M., Branda, E., Corazzi, L., Vaughan-Martini, A., Buzzini, P., *International Journal of Food Microbiology*, 131 (2009) 178-182.
- [16] Quintavalla, S., Vicini, L., *Meat Science*, 62 (2002) 373-380.
- [17] Uz, M., Altinkaya, S.A., *Food Science and Technology*, 44 (2011) 2302-2309.
- [18] Suppakul, P., Sonneveld, K., Bigger, S.W., Miltz, J., *Journal of Food Engineering*, 105 (2011) 270-276.

- [19] Del Nobile, M.A., Conte, A., Buonocore, G.G., Incoronato, A.L., Massaro, A., Panza, O., *Journal of Food Engineering*, 93 (2009) 1-6.
- [20] Appendini, P., Hotchkiss, J.H., *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 3 (2002) 113-126.
- [21] Radheshkumar, C., Münstedt, H., *Reactive & Functional Polymers*, 66 (2006) 780-788.
- [22] Cowan, M.M., Abshire, K.Z., Houk, S.L., Evans, S.N., *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 30 (2003) 102-106.
- [23] Faúndez, G., Troncoso, M., Navarrete, P., Figueroa, G., *BMC Microbiology*, 4 (2004) 1-7.
- [24] Liu, G., Wang, Y., Gui, M., Zheng, H., Dai, R., Li, P., *Food Control*, (2011) doi:10.1016/j.foodcont.2011.09.004
- [25] Vercammen, A., Vanoirbeek, K.G.A., Lurquín, I., Steen, L., Goemaere, O., Szczepaniak, S., Paelink, H., Hendrickx, M.E.G., Michiels, C.W., *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, (2011) doi:10.1016/j.ifset.2011.07.009
- [26] Slongo, A.P., Rosenthal, A., Camargo, L.M.Q., Deliza, R., Mathias, S.P., Aragão, G.M.F., *Food Science and Technology*, 42 (2009) 303-306.
- [27] Buonocore, G.G., Conte, A., Corbo, M.R., Sinigaglia, M., Del Nobile, M.A., *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 6 (2005) 459-464.
- [28] Han, J.H., Floros, J.D., *Journals of Food Processing and Preservation*, 22 (1998) 107-122.
- [29] Buonocore, G.G., Sinigaglia, M., Corbo, M.R., Bevilacqua, A., La Notte, E., *Journal of Food Protection*, 67 (2004) 1190-1194.
- [30] Mastromatteo, M., Barbuzzi, G., Conte, A., Del Nobile, M.A., *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 10 (2009) 222-227.
- [31] Iconomopoulou, S.M., Voyiatzis, G.A., *Journal of Controlled Release*, 103 (2005) 451-464.
- [32] Guzey, D. e McClements, D.J., *Advances in Colloid and Interface Science*, 128 (2006) 227-248.
- [33] Gemili, S., Yemenicioğlu, A., Altinkaya, S.A., *Journal of Food Engineering*, 90 (2009) 435-462.
- [34] Siracusa, V., Rocculi, P., Romani, S., Rosa, M.D., *Trends in Food Science & Technology*, 19 (2008) 634-643.
- [35] Azeredo, H.M.C., *Food Research International*, 42 (2009) 1240-1253.

- [36] Lee, J., Son, S., Hong, S., *Journal of Food Engineering*, 86 (2008) 484-493.
- [37] Sorrentino, A., Gorrasi, G., Vittoria, V., *Trends in Food Science & Technology*, 18 (2007) 84-95.
- [38] Aksoy, E.A., Akata, B., Bac, N., Hasirci, N., *Journal of Applied Polymer Science*, 104 (2007) 3378-3387.
- [39] Saheb, D.N., Jog, J.P., *Advances in Polymer Technology*, 18 (1999) 351-363.
- [40] Neves, I.C., Botelho, G., Machado, A.V., Rebelo, P., *Materials Chemistry and Physics*, 104 (2007) 5-9.
- [41] Puukilainen, E., Koponen, H., Xiao, Z., Suvanto, S., Pakkanen, T. A., *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 287 (2006) 175-181.
- [42] Gemili, S., *Preparation and characterization of antimicrobial polymeric films for food packaging applications*, Tese de Mestrado, Imzir Institute of Technology, 2007.
- [43] Li, Xue, *Development of flax fiber-reinforced polyethylene biocomposites by injection molding*, Tese de Doutorado, University of Saskatchewan, Canada, 2008.
- [44] Han, J., Castell-Perez, M.E., Moreira, R.G., *Food Science and Technology*, 40 (2007) 1545-1554.
- [45] Mauriello, G., De Luca, E., La Stora, A., Villani, F., Ercolini, D., *Letters in Applied Microbiology*, 41 (2005) 464-469.
- [46] Suppakul, P., Sonneveld, K., Bigger, S.W., Miltz, J., *Food Science and Technology*, 41 (2008) 779-788.
- [47] Suppakul, P., Sonneveld, K., Bigger, S.W., Miltz, J., *Food Science and Technology*, 44 (2011) 1888-1893.
- [48] Tao, Y.S., Kanoh, H., Abrams, L., Kaneko, K., *Chemical Reviews*, 106 (2006) 896-910.
- [49] Figueiredo, H., *Reutilização Catalítica de Biossorbentes suportados em zeólitos*, Tese de Mestrado, Universidade do Minho, Braga, 2007.
- [50] Guisnet, M., Ribeiro, F., *Zeólitos: Um nanomundo ao serviço da catálise*, Fundação Galouste Gulbenkian, Lisboa, 2004.
- [51] Montalvo, S., Guerrero, L., Borja, R., Sánchez, E., Milán, Z., Cortés, I., Rubia, M.A., *Applied Clay Science* (2012), doi: 10.1016/j.clay.2012.01.013.

- [52] Kwake-Awuah, B., *Production of silver-loaded zeolites and investigation of their antimicrobial activity*, University of Wolverhampton, 2008.
- [53] Yukselen-Aksoy, Y., *Applied Clay Science*, 50 (2010) 130-136.
- [54] Fox, S., Wilkinson, T., Wheatley, P., Xiao, B., Morris, R., Sutherland, A., Simpson, A., Barlow, P., Butler, A., Megson, I., Rossi, A., *Acta Biomaterialia*, 6 (2010) 1515-1521.
- [55] Fonseca, A., Gonçalves, S., Parpot, P., Neves, I., *Physical Chemistry Chemical Physics*, 11 (2009) 6308-6314.
- [56] Borai, E., Harjula, R., Malinen, L., Paajanen, A., *Journal of Hazardous Materials*, 172 (2009) 416-422.
- [57] Stojakovic, Djordje, Hrenovic, J., Mazaj, M., Rajic, N., *Journal of Hazardous Materials*, 185 (2011) 408-415.
- [58] Reháková, M., Fortunová, L., Bastl, Z., Nagyová, S., Dolinská, S., Jorík, V., Jóna, E., *Journal of Hazardous Materials*, 186 (2010) 699-706.
- [59] Nibou, D., Amokrane, S., Mekatel, H., Lebaili, N., *Physics Procedia*, 2 (2009) 1433-1440.
- [60] Malekpour, A., Millani, M.R., Kheirkhah, M., *Desalination*, 225 (2008) 199-208.
- [61] Inoue, Y., Hoshino, M., Takahashi, H., Noguchi, T., Murata, T., Kanzaki, Y., Hamashima, H., Sasatsu, M., *Journal of Inorganic Biochemistry*, 92 (2002) 37-42.
- [62] Erdem, E., Karapinar, N., Donat, R., *Journal of Colloid and Interface Sciences*, 280 (2004) 309-314.
- [63] Castaldi, P., Santona, L., Enzo, S., Melis, P., *Journal of Hazardous Materials*, 156 (2008) 428-434.
- [64] Ursini, O., Lilla, E., Montanari, R., *Journal of Hazardous Materials B*, 137 (2006) 1079-1088.
- [65] Martins, L., Cardoso, D., *Química Nova*, 29 (2006) 358-364.
- [66] Ostroski, I., Barros, M., Silva, E., Dantas, J., Arroyo, P., Lima, O., *Journal of Hazardous Materials*, 161 (2009) 14104-1412.
- [67] Pina, M., Mallada, Arruebo, M., Urbiztondo, M., Navascués, N., Iglesia, O. e Santamaria, J., *Microporous and Mesoporous Materials*, 144 (2011) 19-27.
- [68] Ribeiro, F. R., Rodrigues, A. E., Rollmann, L.D., Naccache, Claude, *Zeolites: Science and Technology*, NATO Asi Series, Boston, 1984.

- [69] Flanigen, E.D., in: *Introduction to Zeolite science and practice, studies in surface science and catalysis*, Van Bekkum, H., Flanigen, E.M., Jansen, J.C. (eds), *Studies in Surface Science and Catalysis*, Elsevier, Amsterdam, 58, 1991.
- [70] Pescarmona, P.P., *An exploration of silsesquioxanes and zeolites using high-speed experimentation*, Tese de doutoramento, Università di Torino, Itália, 2003.
- [71] <http://www.iza-online.org/> acedido em Maio de 2012.
- [72] Hensen, E.J.M., Van Veen, J.A.R., *Catalysis Today*, 86 (2003) 87-109.
- [73] Čejka, J., Bekkum, H., *Zeolites and ordered mesoporous materials: progress and prospects*, *Studies in Surface Science and Catalysis*, Elsevier, Amesterdão, 157, 2005.
- [74] Nam, S., Scanlon, M.G., Han, J.H., Izydorczyk, M.S, *Journal of Food and Science*, 72 (2007) 477-484.
- [75] Magaña, S., Quintana, P., Aguilar, D., Toledo, J., Chávez, C., Cortés, M., León, L., Pelegrín, Y., López, T., Sánchez, R., *Journal of molecular catalysis*, 281 (2008) 192-199.
- [76] Gordon, T., Perlstein, B., Houbara, O., Felner, I., Banin, E., Margel, S., *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 374 (2011) 1-8.
- [77] Inoue, Y., Kogure, M., Matsumoto, K., Hamashima, H., Tsukada, M., Endo, K., Tanaka, T., *Chemical & Pharmaceutic Bulletin*, 56 (2008) 692-694.
- [78] Inoue, Y., Hoshino, M., Takahashi, H., Noguchi, T., Murata, T., Kanzaki, Y., Hamashima, H. e Sasatsu, M., *Journal of Inorganic Biochemmistry*, 92 (2002) 37-42.
- [79] Lalueza, P., Monzón, M., Arruebo, M., Santamaría, J., *Materials Research Bulletin*, 46 (2011) 2070-2076.
- [80] Monteiro, D., Gorup, F., Takamiya, A., Filho, A., Camargo, E., Barbosa, D., *International Journal of Antimicrobial Agents*, 34 (2009) 103-110.
- [81] Top, A., Ülku, S., *Applied Clay Science*, 27 (2004) 13-19.
- [82] Sabbani, S., Gallego-Perez, D., Nagy, A., Waldman, W.J., Hansford, D., Dutta, P.K., *Microporous and Mesoporous Materials*, 135 (2010) 131–136.
- [83] Inoue, Y., Hamashima, H., *Journal of Biomaterials and Nanobiotechnology*, 3 (2012) 114-117.
- [84] Llorens, A., Lloret, E., Picouet, P.A., Trbojevich, R., Fernandez, A., *Trends in Food Science & Technology*, 24 (2012) 19-29.

- [85] Sondi, I., Sondi, B., *Journal of Colloid and Interface Science*, 275 (2004) 177-182.
- [86] Clement, J., Jarret, P., *Met Based drugs*, 1 (1994) 467-482.
- [87] Zhao, D., Zhou, J., Liu, N., *Applied Clay Science*, 33 (2006) 161-170
- [88] Pinto, R., Marques, P., Neto, C., Trindade, T., Daina, S., Sadocco, P., *Acta biomaterialia*, 5 (2009) 2279-2289.
- [89] Jung, W., Koo, H., Kim, K., Shin, S., Kim, S., Park, Y., *Applied and Environmental Microbiology*, 74 (2008) 2171-2178.
- [90] Zhang, Y., Zhong, S., Zhang, M., Lin, Y., *Journal of Materials Science*, 44 (2009) 457-462.
- [91] Pal, S., Tak, Y., Song, J., *Applied and Environmental Microbiology*, 73 (2007) 1712-1720.
- [92] Kim, J.Y., Lee, C., Cho, M. e Yoon, J., *Water research*, 42 (2008) 356-362.
- [93] Malachová, K., Praus, P., Rybková, Z., Kozák, O., *Applied Clay Science*, 53 (2011) 642-645.
- [94] Ashbolt, N., *Toxicology*, 198 (2004) 229-238.
- [95] Zhou, Y., Xia, M., Ye, Y., Hu, C., *Applied Clay Science*, 27 (2004) 215-218.
- [96] Garza, M., Olguín, M., Sosa, I., Alcántara, D., Fuentes, G., *Microporous and Mesoporous Materials*, 39 (2000) 431-444.
- [97] Kwakye-Awuah, B., Williams, C., Kenward, M.A., Radecka, I., *Journal of Applied Microbiology*, 104 (2008) 1516-1524.
- [98] Copcia, V.E., Luchian, C., Dunca, S., Bilba, N., Hristodor, C.M., *Journal of Materials Science*, 46 (2011) 7121-7128.
- [99] Mekahlia, S., Bouzid, B., *Physics Procedia*, 2 (2009) 1045-1053.
- [100] Hu, C., Xu, Z., Xia, M., *Veterinary Microbiology*, 109 (2005) 83-88.
- [101] Hu, C., Xia, M., *Applied Clay Science*, 31 (2006) 180-184.
- [102] Akhavan, O., Ghaderi, E., *Surface & Coatings Technology*, 205 (2010) 219-223.
- [103] Coleman, N., Bishop, A., Booth, S., Nicholson, J., *Journal of the European Ceramic Society*, 29 (2009) 1109-1117.
- [104] He, L., Liu, Y., Mustapha, A., Lin, M., *Microbiological Research*, 166 (2011) 207-215.
- [105] Jones, N., Ray, B., Ranjit, K.T., Manna, A.C., *Microbiology Letters*, 279 (2008) 71-76.
- [106] Rusin, P., Bright, K., Gerba, C., *Letters in Applied Microbiology*, 36 (2003) 69-72.

- [107] Haile, T., Nakhla, G., Zhu, J., Zhang, H., Shugg, J., *Microporous and Mesoporous Materials*, 127 (2010) 32-40.
- [108] Ali, I., *Materials Science and Engineering A*, 459 (2007) 294-302.
- [109] Gómez, I., Olguín, M.T., Alcantára, D., *Journal of Environmental Management*, 88 (2008) 853-863.
- [110] Petushkov, A., *Synthesis and characterization of nanocrystalline and mesoporous zeolites*, Tese de Doutorado, University of Iowa, 2011
- [111] Haber, J., Block, J., Delmon, B., *Pure and Applied Chemistry*, 67 (1995) 1257-1306.
- [112] El Maskod, I.H.A., Saleh, T.S., Hegazy, E.Z., *Journal of Alloys Compounds*, 506 (2010) 923-927.
- [113] Zampino, D., Ferreri, T., Puglisi, C., Mancuso, M., Zacccone, R., Scaffaro, R., Bennardo, D., *Journal of Materials Science*, 46 (2011) 6734-6743.
- [114] Kaali, P., Strömberg, Aune, R.E., Czél, G., Momcilovic, D., Karlsson, S., *Polymer degradation and Stability*, 95 (2010) 1456-1465.
- [115] Kamisoglu, K., Aksoy, E., Akata, B., Hasirci, N., Baç, N., *Journal of Applied Polymeric Science*, 110 (2008) 2854-2861.
- [116] Brody, A.L., Strunpinski, E.R., Kline, L.R., *Active packaging for food applications*, CRC PRESS, United States of America, 2001.
- [117] Pehlivan, H., Balköse, D., Ülkü S., Tihminlioğlu, *Composites Science and Technology*, 65 (2005) 2049-2058.
- [118] Fernández, A., Soriano, E., López-Carballo, G., Picouet, P., Lloret, E., Gavara, R., Hernández-Munoz, P., *Food Research International*, 42 (2009) 1105-1112.
- [119] Rhim, J., Hong, S., Park, H., Ng, P.K.W., *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54 (2006) 5814-5822.
- [120] <http://www.fda.gov/Food/FoodIngredientsPackaging/FoodContactSubstancesFCS/ucm116567.htm>, acedido em Maio de 2012.
- [121] EFSA, Scientific opinion on the safety evaluation of the substance, silver zeolite A (silver Zinc sodium ammonium alumino silicate), silver content 2-5%, for use in food contact materials, *EFSA Journal*, 9 (2011).

- [122] Commission Regulation (EC) No 1935/2004(2004), on materials and articles intended to come into contact with food and repealing Directives 80/590/EEC and 89/109/EEC
- [123] Commission Regulation (EU) No 10/2011(2011), on plastics materials and articles intended to come into contact with food.
- [124] Ferreira, L., *Encapsulamento de agentes antimicrobianos em nanoestruturas*, Projeto de Licenciatura, Universidade do Minho, Braga, 2010.
- [125] Brune, D., Hellborg, R., Whitlow, H., Hunderi, O., *Surface Characterization*, Wiley-VCH, Alemanha, 1997.
- [126] Sun, S., *Physical Chemistry of Macromolecules: Basic principles and issues*, 2ª edição, John Wiley & Sons, Nova Iorque, 2004.
- [127] Stuart, B. *Infrared Spectroscopy: Fundamentals and Applications*, 1ª edição, John Wiley & Sons, Chichester, 2004.
- [128] Jeffery, G., Bassett, J., Mendham, J. e Denney, R., *Vogel's Textbook of Quantitative Chemical Analysis*, 5ª edição, Longman Scientific & Technical, Londres, 1989.
- [129] Ghesti, G.C., Macedo, J.L., Parente, V.C.I., Dias, J.A., Dias, S.C.L., *Microporous and Mesoporous Materials*, 100 (2007) 27-34
- [130] Lutz, W., Ruscher, C.H., Heidemann, D., *Microporous and Mesoporous Materials*, 55 (2002) 193.
- [131] De Geyter, N., Morent, R., Leys, C., *Surface and Interface Analysis*, 40 (2008) 608-611.
- [132] Gulmine, J.V., Janissek, P.R., Heise, H.M., Akcelrud, L., *Polymer Testing*, 21 (2002) 557-563.
- [133] Rosabal, B., Fuentes, G., Bogdanchikova, N., Bosch, P., Avalos, M., Lara, V., *Microporous and Mesoporous Materials*, 86 (2005) 249-255.
- [134] Padilha, A., Filho, F., *Técnicas de Análise Microestrutural*, 1ª edição, Hemus, Brasil, 2004.
- [135] Goodhew, J., Humphreys, J., Beanland, R., *Electron Microscopy and analysis*, 3ª edição, Taylor & Francis, Londres, 2001.
- [136] Araújo, T., Santos-Filho, J., *Hidroxiapatita Pura e Dopada com Cr³⁺: Produção, Propriedades e Aplicação em Biosensores*, 1ª edição, Brasil, 2008.
- [137] Rebelo, P., *Degradação Catalítica do Polietileno*, Tese de Mestrado, Universidade do Minho, Braga, 2009.

- [138] Kolasinski, K., *Surface Science*, 2ª edição, John Wiley & Sons, USA, 2008.
- [139] Hollas, J., *Modern spectroscopy*, 4ª edição, John Wiley & Sons, USA, 2004.
- [140] Gauglitz, G., Vo-Dinh, T., *Handbook of Spectroscopy*, Wiley-VCH, Weinheim, 2003.
- [141] Prescott, L., Harley, J., Klein, D., *Microbiology*, 3ª edição, John Wiley & Sons, New Jersey, 2005.
- [142] Barr, T.L., *Zeolites*, 10 (1990) 760-765.
- [143] Jezierski, A., Szytula, A., Penc, B., Fus, D., *Journal of Alloys and Compounds*, 317 (2001) 340-346.
- [144] Wertheim, G.k., Wernick, J.H, Hufner, S., *Solid State Communications*, 17 (1975) 417-422.
- [145] Briggs, D., Seah, M.P (eds), in : *Practical Surface Analysis: Auger and X-ray photoelectron spectroscopy*, 2ª edição, Wiley Interscience, USA, 1990.
- [146] Tan, S., Ouyang, Y., Zhang, L., Chen, Y., Liu, Y., *Materials Letters* , 62 (2008) 2122-2124.
- [147] Kaushik, V.K., *Journal of Electron Spectroscopy and Related Phenomena*, 56 (1991) 273-277.
- [148] <http://www.lasurface.com/database/elementxps.php>, acessado em Maio de 2012.
- [149] Quayle, W.H., Lunsford, J.H., *Inorganic Chemistry*, 21 (1982) 97-103
- [150] Quayle, W.H., Peeters, G., Roy, G.L., Vansant, E.F., Lunsford, J.H., *Inorganic Chemistry*, 21 (1982) 2226-2231.